

Aus der Inneren Abteilung des
Martin-Luther-Krankenhauses Berlin-Grunewald
Chefarzt: Professor Dr. med. Hans Witzgall

ABHÄNGIGKEIT DER SPEICHELKONZENTRATION
KÖRPERFREMDE STOFFE
VON DER BLUTWASSERKONZENTRATION
AN DEM MODELL VON FÜNF SULFONAMIDEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Andreas Grüneisen

aus Fürstenwerder / Kr. Prenzlau

1969



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Inneren Abteilung des Martin-Luther-Krankenhauses

Berlin-Grunewald

Chefarzt: Professor Dr.med. Hans W i t z g a l l

Abhängigkeit der Speichelkonzentration körperfremder Stoffe
von der Blutwasserkonzentration an dem Modell von fünf
Sulfonamiden

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Andreas G r ü n e i s e n

aus Fürstenwerder/ Kr. Prenzlau

Dekan: Professor Dr. med. Herbert L a x
Referent: Professor Dr. med. Hans W i t z g a l l
Korreferent: Professor Dr. med. Hans H e r k e n



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin.

Promoviert am: 29. Oktober 1969

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	5
LITERATURÜBERSICHT	7
1. Speichelsekretion	7
2. Sulfonamidverteilung	9
3. Sulfonamidausscheidung	11
EIGENE VERSUCHE	
I. SUBSTANZEN UND VORVERSUCHE	13
a) Substanzen	13
b) Schilderung und Beurteilung der Methode	14
1. Sulfonamidbestimmung	14
2. Proteinbestimmung	14
3. Methoden zur Bestimmung der Plasmawasserkonzentration	15
II. BESTIMMUNG DER SULFONAMIDKONZENTRATION IN PLASMAWASSER UND SPEICHEL	19
a) Allgemeine Versuchsbedingungen	19
b) Einzelversuche	20
1. Sulfanilamid	20
2. Sulfadiazin	20
3. Sulfaäthidol	21
4. Sulfacetamid	21
5. Sulfacarbamid	22
c) Ergebnisse	23
III. VERSUCHE ZUR KLÄRUNG DES AUFFÄLLIGEN VERHALTENS VON SULFACETAMID BEIM ÜBERTRITT IN DEN SPEICHEL	24
1. Theoretische Überlegungen und Versuchsanordnung	24
2. Methodik	25
a) Dünnschichtchromatographie	25
b) Inkubation sulfonamidhaltiger Lösungen	25

3. Durchführung der Versuche	26
a) Speichel	26
b) Plasma	26
c) In vitro	27
4. Ergebnis der Versuche	27

D I S K U S S I O N

I. ÜBERLEGUNGEN ZUR SPEICHELAUSSCHIEDUNG DER SULFONAMIDE UND DEN SIE BESTIMMEN- DEN FAKTOREN	29
A. Tätigkeit der Speicheldrüse	29
B. Eigenschaften der Sulfonamide	31
a) Dissoziationsgrad	31
b) Weitere Eigenschaften der Sulfonamide	34
II. ÜBERLEGUNGEN ZUR METABOLISIERUNG	36
III. BRAUCHBARKEIT DER SPEICHELKONZENTRATION- BESTIMMUNG ZUR ABSCHÄTZUNG DER BIOLOGISCH AKTIVEN FRAKTION	38
a) Sulfonamide	38
b) Andere Substanzen	38
ZUSAMMENFASSUNG	40
LITERATUR	41

EINLEITUNG

Die Erkenntnisse über die Grundlagen der Verteilung von körperfremden Substanzen im Organismus haben sich entscheidend verändert. Lange Zeit stand als Bezugssystem die Höhe des Blutspiegels im Vordergrund; man nahm an, damit ein Maß für die Verteilung eines Stoffes im Körper gefunden zu haben. BENNHOLD (6) forderte eine Vehikelfunktion der Albumine, die ein Pharmakon aus dem Blut bis zu seinem Wirkungsort transportieren sollten. Inzwischen ist diese Theorie abgelöst durch die Erkenntnis, daß die Albumin-Pharmakon-Bindung im Plasma reversibel ist, dem Adsorptionsgesetz folgt, und daß ein Gleichgewicht besteht zwischen gelöstem und gebundenem Anteil im Blut, wobei der Abfluß vom Gefäß zum Wirkungsort einer Dialyse des gelösten Anteils entspricht; diesen gelösten Anteil bezeichnet man als die "biologisch aktive" Fraktion der Substanz. Bei einigen körpereigenen Substanzen wurden diese Verteilungsfragen besonders interessant und auf Grund der neuen Erkenntnisse wurde eine Erklärung für mehrere sogenannte "Transportkrankheiten" wie Morbus Wilson, Hämochromatose und Hypercorticismus wahrscheinlich. Sie stützt sich darauf, daß körpereigene Stoffe teilweise ein spezifisches Trägereiweiß haben; fällt dieses aus, so kommt es zu einem Anstieg der biologisch aktiven Konzentration des Stoffes im Blutwasser mit nachfolgender pathologischer Gewebsanreicherung.

Die Bestimmung der Blutwasserkonzentration eines Stoffes trifft im Vergleich zu seiner Blutkonzentration auf größere Schwierigkeiten. Besonders wegen ihrer umständlichen Methodik läßt sie sich kaum routinemäßig verwenden. Eine Ausweichmöglichkeit würden Flüssigkeiten bieten, in denen ein Pharmakon in derselben Konzentration auftritt wie im Blutwasser, die also in dieser Beziehung einem Plasmaultrafiltrat entsprechen. Die hier in Frage kommenden Flüssigkeiten sind Liquor und Kammerwasser; aber auch diese wird man kaum praktisch verwenden können. Dagegen ist die Speichelgewinnung leicht und in ausreichender Menge möglich. Insofern ist die Mitteilung von GREAVES und WEST (24) interessant, in der für Cortisol die

Möglichkeit beschrieben wurde, durch Messung der Speicherkonzentration die Konzentration im Plasmawasser zu bestimmen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Verteilung körperfremder Substanzen zwischen Speichel und Plasmawasser bei verschiedenen Konzentrationen an einem leicht übersehbaren Modell zu bestimmen. Als Testsubstanzen sind die Sulfonamide besonders geeignet: sie sind leicht nachweisbar und werden während der Körperpassage nur wenig metabolisiert. Außerdem setzen Körpermembranen ihrer Passage kaum Hindernisse entgegen. Für unsere Fragestellung am wichtigsten ist die Tatsache, daß sich die einzelnen Verbindungen sehr unterschiedlich auf die Phasen des Blutes verteilen. Es gibt fast völlig an Plasmaeiweiß gebundene und fast völlig im Plasmawasser gelöste Sulfonamide. Bei der Auswahl der Substanzen wurden Verbindungen mit sehr gegensätzlichem Verhalten im Blut herangezogen.

LITERATURÜBERSICHT

1. Speichelsekretion

Menge und Zusammensetzung des Speichels variieren mit der Art der aufgenommenen Nahrung. Die durchschnittliche Tagesmenge beträgt 1 - 1.5 Liter. Der Speichel ist dem Blut gegenüber hypotonisch, der pH liegt meist im leicht sauren Bereich (6.7). Die Sekretion erfolgt nervös-reflektorisch. Variation der Zusammensetzung kommt durch unbedingte Reflexe zustande, die besonders von den Geschmacksrezeptoren der Zunge ausgelöst werden. Die Erregung läuft zum Nucleus salivatorius in der Medulla oblongata und von dort über die sekretorischen Nerven, die hauptsächlich parasympathische und zum kleineren Teil sympathische Fasern führen, zur Drüse.

Die Sekretion des Speichels ist eine aktive Leistung der Acinuszelle; dabei kann der Sekretionsdruck den arteriellen Blutdruck übersteigen (16, 65). Allerdings wird der Primärspeichel auf seinem Wege durch das Gangsystem Veränderungen in seinem Gehalt unterworfen, ehe er die endgültige Zusammensetzung hat.

Über den Mechanismus, der zur Sekretion des Primärspeichels in das Drüsenlumen führt, herrscht noch weitgehend Uneinigkeit, ebenso wie über das damit zusammenhängende Verhalten der Elektrolyte. Auf Grund experimenteller Ergebnisse wurden verschiedene Sekretionstheorien aufgestellt. So nahm YOSHIMURA (65) in Weiterführung der Ergebnisse von LUNDBERG (36) eine Anionenpumpe in der Basalmembran der Acinuszelle an, die durch Nervenreiz aktiviert wird. Der Primärspeichel, der aus einem Anion (Cl^-), einem Begleitkation und Wasser besteht und in der Zusammensetzung der Gewebeflüssigkeit ähnelt, wird durch Interzellularspalten in den Gang sezerniert. Dabei tritt ein negatives Sekretionspotential auf. Über 50% des Primärspeichels wird auf diese Weise gebildet. Der Rest besteht aus intrazellulärem Wasser, das mit K^+ und Amylase angereichert ist und gleichzeitig sezerniert wird. Im Gangsystem wird durch Na^+ - und Cl^- -Reabsorption (55, 64) und Bikarbonat-Sekretion der hypotone Endspeichel gebildet. BURGEN (12, 13) wandte sich entschieden gegen diese These des isotonischen Primärspeichels mit nachfolgender Na^+ - und Cl^- -Reabsorption. Da er eine Na^+ -Zunahme im Gangspeichel bei Nervenreiz feststellen konnte, schloß er auf zwei verschiedene Möglichkeiten für das Verhalten des Natrium im Gang:

- a) hypotone Primärsekretion; im Gangsystem Nettoeinstrom von Natrium, der nervenreizabhängig ist; d.h., bei Nervenreiz kommt es zu einem Na^+ -Einstrom, der die Speichelfluß-Zunahme übertrifft. Dadurch steigt bei Nervenreiz die Na^+ -Konzentration im Speichel an.
- b) Gleichgewicht von Na^+ -Ein- und Ausstrom, wobei in geringer Reizfrequenz der Ausstrom den Einstrom übertrifft (Verringerung des Speichel- Na^+), bei hoher Reizfrequenz umgekehrt.

Als auslösenden Faktor nahm er eine K^+ -Sekretion der Acinuszelle an, bei der auch Bikarbonat primär ausgeschieden wird. Im Gang wird K^+ reabsorbiert und Na^+ sezerniert. Das K^+ gelangt auf dem Blutweg in die Acinuszelle zurück und steht zur erneuten Sekretion zur Verfügung.

Eine eindeutige Aussage läßt sich demnach bisher nicht machen. Der Grund für diese Schwierigkeit scheint in dem schnellen Abtransport des Speichels zu liegen, wodurch eine genaue Analyse technisch sehr erschwert wird. In jedem Fall spielt auch das Gangsystem eine wichtige Rolle bei der Speichelsekretion. Es scheint für die einzelnen Ionen bevorzugte Durchtrittsorte zu geben, wodurch die Endspeichelkonzentration erheblich verändert wird (12, 31).

Nichtelektrolyte werden passiv in den Speichel ausgeschieden. Gemäß der Natur der Lipoidmembran wiesen AMBERSON und HÖBER (3) auf den Einfluß von Molekulargewicht und Lipoidlöslichkeit auf die Sekretion dieser Stoffe mit dem Speichel hin. Sie stellten eine Abnahme der Sekretionsgeschwindigkeit mit Zunahme des Molekulargewichtes fest und für gleichmolekulare Stoffe eine Zunahme der Sekretionsgeschwindigkeit mit steigender Lipoidlöslichkeit. BURGEN bestätigte diese Ergebnisse. Er zeigte, daß das gut lipoidlösliche Chloramphenicol trotz seines relativ hohen Molekulargewichtes schnell in den Speichel übertritt, während bei lipoidunlöslichen Stoffen das Molekulargewicht die beschriebene Rolle spielt (11). Nicht endgültig geklärt ist die Frage nach dem Vorhandensein und der Größe von Poren in der Membran. Nach Angaben von BURGEN können Moleküle von über 3.2 Å Radius die Membran nur unter erheblichen Schwierigkeiten überwinden. Bei Nervenreiz sollen die vorhandenen Poren stark erweitert werden, wodurch die Permeabilität für schlecht sezernierbare Substanzen steigt, so daß ein Anstieg der Speichelkonzentration resultiert. Im Gegensatz dazu stehen die gut speichelgängigen Substanzen, die nur bei kleiner Sekretionsrate im Speichel gleiche Konzentrationen erreichen wie im Plasma (1, 2, 32, 50).

Bei den teilweise dissoziierten Verbindungen gelangt bevorzugt die undissoziierte Form in den Speichel. Das legen Versuche von KILLMANN und THAYSEN (28) und RASMUSSEN (44) nahe, bei denen für schwache Säuren eine Abhängigkeit der Speichelgängigkeit vom pK_a und von der Lipoidlöslichkeit festgestellt wurde.

Interessante Resultate über eine Metabolisierung von Substanzen, die im Speichel ausgeschieden werden, durch die Speicheldrüse selbst erhielt man im Verlauf von Untersuchungen von Corticosteroiden. Man hatte zunächst eine Parallelität von Plasma- und Speichelspiegeln festgestellt (49, 51, 54) und vermutet, daß man allein aus der Speichelkonzentration direkt auf die im Plasmawasser vorliegende Menge an diffusiblem Cortisol schließen könne und damit auch auf die im Gewebe zur Verfügung stehende Menge, die man bisher nicht ausreichend genau bestimmen konnte. Bestärkt wurde man in dieser Hoffnung, als GREAVES und WEST (24) einen während der Gravidität leicht erhöhten Speichelspiegel für Cortisol nachwiesen und diese Beobachtung in Zusammenhang stellten mit der von DOE u.a. (18) gefundenen Erhöhung des nicht-eiweißgebundenen Cortisols im Plasma während der Gravidität.

Allerdings fanden sie im Speichel Werte für Cortisol, die bedeutend tiefer, und für Cortison, die bedeutend höher lagen als die ihnen aus der Literatur bekannten Werte im Plasma für diffusibles Cortisol bzw. Cortison. Daraus schlossen sie auf eine Umwandlung von Cortisol in Cortison in der Speicheldrüse. KATZ und SHANNON (27) bestätigten diesen Abbau ebenso wie BETHELL u.a. (7), die durch Radioisotopen auch für das stärkste bisher bekannte 17-Hydroxy-Corticosteroid Betamethason einen analogen Abbau nachwiesen. So wird die Möglichkeit, den Gewebespiegel aus dem Speichelspiegel zu bestimmen, zumindest für solche Substanzen fragwürdig, die während der Körperpassage verändert werden, sofern man nicht den Grad des Abbaus sicher feststellen kann.

2. S u l f o n a m i d v e r t e i l u n g

Seit man sich von der Vorstellung lösen konnte, daß körperfremde Stoffe durch einen "gerichteten Transport" mittels Albuminträgern der Körperzelle zugeführt werden (BENNOLD), hat die Blutwasserkonzentration für die Beurteilung von Verteilungen im menschlichen Körper auch für Sulfonamide erheblich an Bedeutung gewonnen. Für den Vergleich mit anderen Räumen des Körpers bekam man jetzt aussagekräftigere Ergebnisse als bei Vergleichen mit der Plasmakonzentration möglich ist, obwohl auch diese noch verschiedentlich herangezogen wird (8). Nach WITZGALL finden sich die Sulfonamide in anderen Körperräumen nach Maßgabe ihrer Plasmaultafiltratkonzentration und der dortigen Adsorptionsmöglichkeiten wieder (61). Das bedeutet z.B. für Liquor oder Kammerwasser, daß die Sulfonamide dort in derselben Konzentration auftreten wie im Plasmawasser, da diese Räume praktisch eiweißfrei sind. Diese Abhängigkeit der Konzentration in anderen Körperräumen von dem gelösten Anteil im Plasma wurde verschiedentlich bestätigt (22, 34, 38, 58, 66). ANTON (4) fand bei Verdrängung von Sulfonamiden aus ihrer Eiweißbindung eine verstärkte Diffusion in das Gewebe. WÖHLER u. Mitarb. (62, 63) fanden ebenfalls höhere Liquorspiegel, je höher die Konzentration an Sulfonamid im Plasmawasser war, deuteten dies aber als zusammenhängend mit der Wirkungsdauer der Substanzen; d.h., je stärker die Plasmaeiweißbindung ist, desto länger ist die Wirkung. WITZGALL hingegen lehnt einen Zusammenhang von Plasmaeiweißbindung und Wirkungsdauer ab: die Bindung hat nur Bedeutung für die Verteilung der Sulfonamide im Körper. Der mehrfach beschriebene Anstieg der Sulfonamidkonzentration im Liquor bei Meningitis ist dadurch zu erklären, daß hierbei im Liquor Eiweißkörper und Zellen auftreten, wodurch die Adsorptionsmöglichkeiten für die Sulfonamide erhöht werden (61). Derselbe Vorgang wurde von BÜNGER (14) für wechselnd eiweißhaltigen Ascites und von WITZGALL für Exsudate und Transsudate beschrieben, bei denen der Sulfonamidgehalt mit dem Eiweißgehalt steigt. Ebenso dürfte die von MASHITA (39) gefundene Erhöhung der Sulfonamidkonzentration in einer an Lobärpneumonie erkrankten Lungenhälfte gegenüber der gesunden Seite

zu deuten sein.

Das Auftreten von Sulfonamiden in gleicher Konzentration in Plasmawasser und anderen Körperflüssigkeiten führte zu der Hypothese, daß es bei einem stabilen Gleichgewicht zu gleichen Konzentrationen an gelöstem Sulfonamid im ganzen Körper kommt, daß also die Blutwasserkonzentration der Gewässerkonzentration entspricht und die Konzentrationsunterschiede in den einzelnen Räumen nur durch die verschiedenen Adsorptionsmöglichkeiten der Sulfonamide bewirkt werden (61); dabei ist die biologische Aufgabe der Membranen nicht die Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgefälles zwischen den getrennten Medien, sondern sie stellt für die einzelnen Substanzen ein zeitlich begrenztes Hindernis dar, wird also nur für die Verteilungskinetik wirksam. Die Behinderung der einzelnen Sulfonamide beim Durchtritt durch die Schrankenmembranen ist verschieden stark. Deshalb versuchte man, die Sulfonamideigenschaften für ein schnelles oder langsames Übertreten aus einem Medium in ein anderes verantwortlich zu machen und stellte als wichtigsten Faktor den Dissoziationsgrad der Substanzen in den Vordergrund. VONKENNEL und SCHMIDT (57) zeigten, daß dissoziierte Sulfonamide den Liquor sehr viel langsamer erreichen als undissoziierte. GOLDSWORTHY (23) beschrieb dieselbe Abhängigkeit für die Penetration ins Gehirn. LANGECKER (30) zeigte, daß im Gegensatz zu Sulfanilamid die stark dissoziierten Sulfacarbamid und Sulfanilsäure in sehr viel geringeren Mengen in Liquor und Kammerwasser erscheinen als nach der Plasmawasserkonzentration zu erwarten war. Außerdem dauerte diese Diffusion erheblich länger als der Übertritt in die Pericardflüssigkeit, wo auch die dissoziierten Sulfonamide schnell in Konzentrationen auftraten, die ungefähr dem Plasmawasser entsprachen. Die transsudatbildenden Endothelien (Pleura, Pericard) sind daher nicht als hemmende Membranen aufzufassen; dagegen setzen Schrankenmembranen - wie Liquor und Kammerwasser zeigen - dem Eindringen dissoziierter Verbindungen erheblichen Widerstand entgegen. RALL u.a. (41, 42) veränderten den Blut-pH und stellten für die Substanzen, deren Dissoziation dadurch geändert wurde, eine entsprechende Änderung ihres Konzentrationsquotienten Liquor/Plasmawasser fest; stieg die Dissoziation an, so nahm der Quotient ab.

Als zweite Eigenschaft von Bedeutung wurde die Lipidlöslichkeit festgestellt. SCHANKER (45) forderte von Arzneimitteln neben der geringen Ionisation bei Blut-pH eine gute Lipidlöslichkeit der undissoziierten Form als Voraussetzung für ein gutes Eindringen in den Liquor. Nach seinen Angaben nähern sich die Konzentrationen in Liquor und Plasmawasser im Gleichgewicht einander. Die Verzögerung der Diffusion für schlecht lipidlösliche Verbindungen ist dagegen so groß, daß die Einstellung des Gleichgewichtes verhindert wird. WITZGALL (59) zeigte in vitro an der Erythrocytenmembran, daß stark ionisierte und schlecht lipidlösliche Sulfonamide erheblich langsamer in den Erythrocyten eindringen als andere. Die Absorptionsversuche von KAKEMI (25) und AUSTIN (5) von Sulfonamiden aus dem Rectum von Ratten bzw. dem Magen von Wiederkäuern ergaben, daß auch bei diesen Organen die geschilderten Sulfonamideigenschaften (geringe Dissoziation, gute Lipidlöslichkeit) entscheidend für die Geschwindigkeit

der Absorptionsvorgänge sind.

Bei seinen Versuchen am Erythrocyten stellte WITZGALL fest, daß das Sulfaäthidol - trotz ähnlicher Eigenschaften - sehr viel schneller in den Erythrocyten eindringen kann als das Sulfacetamid. Da der grundsätzliche Unterschied zwischen beiden Stoffen die Höhe der Plasma-Eiweißbindung ist, dürfte die stärkere Grenzflächenaktivität des Sulfaäthidol entscheidend für die schnellere Diffusion sein. Damit gewinnt die Grenzflächenaktivität bestimmenden Charakter für die Geschwindigkeit der Verteilung von Sulfonamiden sowohl im Blut als auch im Körper.

3. S u l f o n a m i d a u s s c h e i d u n g

Die Ausscheidung der Sulfonamide in der Milch und im Speichel wurde mehrfach untersucht. Die in der Milch gefundenen variierenden Sulfonamidkonzentrationen (33, 40, 46) wurden von RASMUSSEN (43) mit dem pK der Sulfonamide in Zusammenhang gebracht. Nach Berücksichtigung der Sulfonamid-Eiweißbindungen in Plasma und Milch fand er für die gelösten Anteile in beiden Medien ein Gleichgewicht. Die Konzentration der Sulfonamide ist allerdings nicht in jedem Fall in beiden Flüssigkeiten gleich, sondern nur für praktisch undissoziierte Verbindungen. Die übrigen sind im Milchwasser gemäß ihrer stärkeren Dissoziation in geringerer Konzentration vorhanden. So wie durch Veränderung des Blut-pH für diese Substanzen das Konzentrationsverhältnis Liquor/Plasmawasser verändert werden konnte (42), war das analog auch bei Variationen im Milch-pH möglich (43). AUSTIN (5) und SISODIA und STOWE (52, 53) bestätigten diese Feststellungen und wiesen darauf hin, daß die Sekretionsgeschwindigkeit der Milch keinen Einfluß auf die Verteilungsvorgänge hat.

Über das Auftreten der Sulfonamide im Speichel liegen verschiedene Arbeiten vor. Die meisten teilen jedoch lediglich die Tatsache der Ausscheidung mit, die FICKLING (20) als erster beschrieb; mehrfach wurde eine Parallelität der Spiegel von Speichel und Plasma festgestellt (9, 28). Nur zwei Autoren beschäftigten sich mit den Ursachen der unterschiedlichen Speichelkonzentrationen von Sulfonamiden. Beide nahmen eine passive Ausscheidung der Sulfonamide in den Speichel an und fanden keinerlei Bindung von Sulfonamiden an Eiweiß im Speichel (28, 44). KILLMANN und THAYSEN nahmen eine Abhängigkeit der Ausscheidung vom Dissoziationsgrad an, fanden aber nicht einmal für die völlig undissoziierten Sulfonamide ein Gleichgewicht zwischen Speichel- und Plasmawasserkonzentration; außerdem blieben sämtliche anderen Faktoren, die als wirksam für eine schnelle Verteilung von Sulfonamiden beschrieben wurden, unberücksichtigt. Eine Abhängigkeit der Ausscheidung von der Speichel-Sekretionsrate lehnten die Autoren ab. RASMUSSEN (44) fand im alkalischen Speichel von Wiederkäuern, daß Sulfonamide mit einem pK von 8.0 und darunter im Speichel gegenüber dem Plasmawasser konzentriert wurden, während Sulfanilamid als praktisch undissoziiertes Sulfonamid im Speichel und im Plasma-

wasser gleiche Konzentrationen erreichte. Gute Lipoidlöslichkeit hält er für einen wichtigen Faktor für eine hohe Ausscheidungsrate im Speichel; auch er lehnt eine Abhängigkeit von der Speichel-Sekretionsrate ab. Außerdem fand er für Sulfacetamid im Speichel einen Wert, der im Gegensatz zu seinen Überlegungen stand und den er nur mit der sehr geringen Lipoidlöslichkeit dieses Sulfonamids erklären konnte: Sulfacetamid wurde nämlich trotz eines pK_a unter 8 im Speichel nicht konzentriert, sondern erschien nur in sehr geringen Mengen.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Nach der bisher bekannten Literatur spielen auch bei sezernierenden Organen wie Milch- und Speicheldrüse die Eigenschaften der Schrankenmembranen eine wichtige Rolle für die Sulfonamidausscheidung: geringe Ionisation und gute Lipoidlöslichkeit werden als Kriterien für eine hohe Ausscheidung genannt. Die Geschwindigkeit der Sekretion dagegen hat keinen Einfluß auf die Konzentration der Sulfonamide im Sekret.

EIGENE VERSUCHE

I. SUBSTANZEN UND VORVERSUCHE

a) S u b s t a n z e n

Es wurden Versuche mit fünf verschiedenen Sulfonamiden durchgeführt:

p-aminobenzolsulfonamid (Sulfanilamid)

p-aminobenzolsulfonacetylamid (Sulfacetamid)

p-aminobenzolsulfocarbamid (Sulfacarbamid)

2-(p-aminobenzolsulfonamido)-pyrimidin (Sulfadiazin)

2-(p-aminobenzolsulfonamido)-5-äthylthiodiazol (Sulfaäthidol)

Im Folgenden werden der Einfachheit halber die in Klammern aufgeführten Kurznamen verwendet.

Eigenschaften	Molekulargewicht	pK _a	Strukturformel
Sulfanilamid	172	10.4	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)N)cc1</chem>
Sulfadiazin	250	6.28	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ncnc3ccccc23)cc1</chem>
Sulfaäthidol	284	6.14	<chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2nc(s2)CC)cc1</chem>
Sulfacetamid	214	5.4	<chem>CC(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)N)cc1</chem>
Sulfacarbamid	213	5.4	<chem>NC(=O)Nc1ccc(S(=O)(=O)N)cc1</chem>

Reihenfolge nach abnehmender Lipoidlöslichkeit (nach WITZGALL)

Sulfaäthidol
Sulfadiazin
Sulfanilamid
Sulfacarbamid
Sulfacetamid

Die Auswahl der Substanzen erfolgte unter Berücksichtigung

ihrer Verteilung im Blut (59): Sulfacetamid und Sulfacarbamid finden sich bevorzugt im Plasmawasser gelöst; die Anteile, die an Plasmaeiweiß oder Erythrocyten gebunden sind, sind gering. Sulfaäthidol ist stark an Plasmaeiweiß gebunden, in Blutwasser und Erythrocyten dagegen kaum vorhanden. Sulfadiazin hat eine wesentlich schwächere Plasma-Eiweißbindung als Sulfaäthidol, dafür einen höheren Anteil im Plasmawasser gelöst. Der Anteil in den Erythrocyten ist gering. Sulfanilamid wird neben dem Plasmaeiweiß besonders an die Erythrocyten gebunden.

b) Schilderung und Beurteilung der Methode

1. Sulfonamidbestimmung

Die Konzentration der Sulfonamide im Speichel und im Plasma und ihren Ultrafiltraten wurde aus 2 ml Speichel bzw. 1 ml Plasma bestimmt. Die Messung erfolgte nach der Methode von BRATTON und MARSHALL (10) durch Diazotierung und Kupplung mit α -Naphthylaethylendiaminchlorhydrat und kolorimetrische Bestimmung am Photometer Zeiss bei 540nm. Zur Enteiweißung wurde 20%ige Trichloressigsäure benutzt und der Niederschlag abfiltriert. Das Eiweiß, das sich noch im Plasma-Ultrafiltrat befand, ließ sich mit Trichloressigsäure nicht mehr ausfällen. Für jedes Sulfonamid wurde eine eigene Eichkurve aufgestellt. Die Fehlerbreite bei unseren Versuchen lag für Plasma bei $\pm 3.5\%$, für Speichel bei $\pm 3.0\%$. Die Grenzen der Methode lagen bei Konzentrationen von 30 $\mu\text{g}\%$ Sulfonamid. Tiefere Konzentrationen waren mit unserem Versuchsaufbau nicht mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen.

2. Proteinbestimmung

Bei jeder Probe von Plasma, Speichel und ihren Ultrafiltraten wurde der Eiweißgehalt bestimmt. Dazu wurde der Speichel 1:10, das Plasma 1:100 verdünnt, die Ultrafiltrate blieben unver-

dünnt. Es wurde die Methode von LOWRY (35) verwendet: Zur Analyse (0.1 ml) wurde im Abstand von 15 min. Folinlösung (CuSO_4 und Kalium-Natrium-Tartrat in Natriumcarbonatlösung) und 0.2 ml Phenol-Reagenz gegeben; nach einer $3/4$ Stunde erfolgte die Extinktionsmessung. Mit Rinderalbumin wurde eine Eichkurve aufgestellt. Die Messung erfolgte am Photometer Zeiss bei 750nm.

3. Methoden zur Bestimmung der Plasmawasserkonzentration

a) Ultrafiltration

Zur Ultrafiltration wurden druckfeste Filtergeräte (Filterdurchmesser 9 cm) benutzt. Der Filtrationsdruck betrug bei allen Versuchen 5 Atm. (Stickstoff). Die Filter wurden in Wasser aufbewahrt und vor Versuchsbeginn zwischen Fließpapier getrocknet (Porendichte: feinst, Sartorius-Membran-Filtergesellschaft). Zur Filtration wurden jeweils 5 ml Plasma und 10 ml Speichel eingesetzt. Durchschnittlich 15 min. nach Filtrationsbeginn zeigten sich die ersten Abscheidungen des Filtrats, beim Speichel bereits nach 5 min. Zunächst wurde zur Korrektur der Filtratkonzentration 1 ml des Filtrats verworfen, da zuerst das Filterwasser dem Filtrat beigemischt wird. Später war die Filtratkonzentration konstant. Nach etwa zwei Stunden war die Filtration beendet.

Berücksichtigte Fehlerquellen:

Der Wassergehalt der Filter betrug durchschnittlich 0.4 bis 0.6 g. Die Sulfonamidkonzentration stieg zu Beginn der Filtration im Filtrat an und erreichte nach weniger als 1 ml einen konstanten Wert. So genügte es, den ersten ml des Filtrats zu verwerfen, um genaue Ergebnisse zu erhalten.

Riß ein Filter während des Versuchs, so wurde der Wert nicht berücksichtigt, auch wenn genügend Plasma oder Speichel für eine erneute Filtration gerettet werden konnte, denn durch das Filterwasser war nun der Wert verdünnt und bei den geringen eingesetzten Mengen erhielt man deutlich erniedrigte Ergebnisse.

b) Gleichgewichtsdialyse

Je 1 ml Leerplasma wurde in einem Cellulose-Dialysierschlauch (Visking-Gesellschaft) in 10 ml Krebs-Ringer-Phosphatpuffer eingebracht, in dem das Sulfonamid in einer Konzentration von 1, 2, 3, 4 bzw. 5 mg% gelöst war, und 24 Stunden lang gedreht. Während dieser Zeit stellte sich über die eiweißundurchlässige Membran ein Gleichgewicht in der Sulfonamidverteilung zwischen Plasma und Puffer ein. Dann wurde die Sulfonamidkonzentration im Innen- und Außenmedium nach BRATTON und MARSHALL bestimmt. Aus der Differenz der Konzentrationen von Plasma und Puffer wurde der jeweilige an Plasmaeiweiß gebundene Sulfonamidanteil berechnet.

Berücksichtigte Fehlerquellen:

Bei der Durchführung der Dialyse wurde darauf geachtet, daß die Flüssigkeitsspiegel innerhalb und außerhalb des Schlauches gleich hoch waren, um eine Verdünnung des Plasmas durch Pufferlösung zu verhindern.

Im Vorversuch wurde geprüft, ob sich die Sulfonamide in sämtlichen verwendeten Konzentrationen in 10 ml Puffer lösen ließen, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch eventuell ausfallendes Sulfonamid zu vermeiden. Dabei wurde eine zwar verschieden gute, aber doch immer vollständige Lösung der Sulfonamide bei allen Konzentrationen von 1-5 mg% festgestellt.

Beurteilung der beiden Methoden:

Die zunächst verwendete Methode der Ultrafiltration mußte nach wenigen Versuchen verlassen werden, da keine ausreichende Sicherheit für die mit dieser Methode erreichten Ergebnisse bestand: Die Membranadsorption des Ultrafilters konnte nicht ausreichend genau bestimmt werden. Ein Teil des Sulfonamids wird bekanntlich an der Filtermembran adsorbiert, so daß zu niedrige Ergebnisse vorgetäuscht werden. Bei Bestimmung des Filtrationsverlustes aus wässrigen Lösungen der Sulfonamide in Konzentrationen von 0,5, 1 und 5 mg% erhielt man bei einer eingesetzten Menge von 5 ml einen Filterverlust von durchschnittlich 20%, bei einer Menge von 15 ml jedoch einen Verlust von nur 10%. Überdies sind diese Ergebnisse nicht auf

das Plasma zu übertragen, da im Plasma die Eiweißbindung mit der Membran in Konkurrenz tritt und so die Adsorption deutlich verändert (WITZGALL). Eine Bestimmung der Adsorption durch Einbringen des Filters in Plasma mit bestimmter Sulfonamidkonzentration und Messung der Abnahme dieser Konzentration, wie es WITZGALL vorgeschlagen hat, ließ sich bei unserer Versuchsanordnung nicht durchführen, da wir nur je 5 ml Plasma zur Filtration zur Verfügung hatten und nach unseren Vorversuchen der Meinung waren, daß die eingesetzte Menge einen Einfluß auf die Größe der Membranadsorption ausübt, so daß wir die Adsorption nicht in einer größeren Menge bestimmen zu dürfen glaubten als wir im Versuch auch tatsächlich verwendeten. Da uns die Diskrepanz zwischen unseren experimentellen Filtratwerten und den mehrfach in der Literatur angegebenen sehr groß erschien und wir über die Membranadsorption zu keiner ausreichend genauen Aussage kommen konnten, wurde die Methode der Plasma-Ultrafiltration verlassen und statt dessen die Eiweißbindung der Sulfonamide mit Hilfe der oben erwähnten Gleichgewichtsdialyse bestimmt.

Die mit dieser Methode bestimmten Werte wurden als Prozent gebundenes Sulfonamid gegen die Gesamtplasmakonzentration graphisch dargestellt und die Plasma-Ultrafiltratwerte nach diesen Ergebnissen korrigiert. Im weiteren erscheinen unter der Bezeichnung "Plasma-Ultrafiltrat" immer diese korrigierten Werte. Es zeigte sich, daß die prozentuale Abnahme des gebundenen Sulfonamidanteils kontinuierlich war, wenn eine bestimmte Plasmakonzentration überschritten war.

Die Höhe der Plasma-Eiweißbindung ist für die einzelnen Sulfonamide schon verschiedentlich bestimmt worden. Sie ist für jedes Sulfonamid eine typische Größe (SCHOLTAN 48). Am sichersten ist sie vermittels Gleichgewichtsdialyse zu bestimmen (47). Die Eiweißbindung ist abhängig von der Sulfonamidkonzentration im Plasma (17, 43), d.h., mit steigender Sulfonamidkonzentration nimmt der prozentuale Anteil des freigelosten Sulfonamids zu. Die Plasma-Eiweißbindung folgt in therapeutischen Konzentrationen der FREUNDLICH'schen Ad-

sorptionsisotherme (21, 47, 59), in hohen Konzentrationen infolge der beschränkten Eiweißoberfläche der LANGMUIR'schen Beziehung (39, 59).

c) Versuchspersonen; Speichelgewinnung

Für die Versuche standen fünf gesunde Versuchspersonen im Alter von 23 bis 32 Jahren zur Verfügung. Die Substanzen wurden als Reinsubstanz in säurelöslichen Kapseln oral verabreicht. Die Verträglichkeit war im allgemeinen gut. Nach Sulfacetamid traten in einem Fall leichte allergische Hauterscheinungen auf. Zwischen den einzelnen Versuchen lag eine Pause von mindestens drei Tagen, abhängig von der Geschwindigkeit der Ausscheidung des betreffenden Sulfonamids.

Der Speichel wurde von den Versuchspersonen spontan produziert, also ohne Zuhilfenahme von Kaugummi oder ähnlichen Speichellockern. Die Zeit, in der 10 ml Speichel gewonnen werden konnten, schwankte zwischen 10 und 20 min., war aber bei derselben Versuchsperson ziemlich konstant. Der pH des Speichels wurde nicht generell gemessen. Bei mehrfach durchgeführten Stichproben lag er immer zwischen 6.5 und 6.9.

Der durchschnittliche Plasma-Eiweißgehalt betrug bei den Versuchspersonen zwischen 7.0 und 7.5 g%. In den Plasma-Ultrafiltraten war die Konzentration zwischen 9 - 12 mg%. Im Speichel betrug der Eiweißgehalt 150 bis 200 mg% und in dessen Ultrafiltrat 20 - 30 mg%, d.h., daß wie zu erwarten im Speichel die sezernierten Proteinkörper im Verhältnis kleinemolekularer sind, wodurch eine größere Menge das Ultrafilter passieren kann.

Berücksichtigte Fehlerquellen:

Die Speichelsekretionsgeschwindigkeit war bei den einzelnen Versuchspersonen verschieden groß. Da aber diese Größe auf den für uns bedeutsamen Konzentrationsquotienten Speichel/Plasmawasser (im Folgenden S/Pw) nach den Arbeiten von KILLMANN und THAYSEN (keine Sekretionsabhängigkeit für Sekretionsraten von 0.2 bis 2.0 ml/min.) und RASMUSSEN (keine Abhängigkeit zwischen 0.04 und 3.0 ml/min.) keinen

Einfluß hat, wurden keine eigenen Versuche zur Bestätigung dieses Sachverhaltes unternommen.

Bei der Enteiweißung des Speichels wurden zunächst gemäß dem gegenüber Plasma geringen Eiweißgehalt zu 2 ml Speichel nur 1.6 ml Trichloressigsäure zugesetzt (zu 1 ml Plasma 1.6 ml Säure). Bei der Filtration verblieb jedoch eine Trübung, die von Fall zu Fall verschiedene Stärke hatte, wodurch eine genaue Messung der Speichelwerte unmöglich gemacht wurde. Setzte man dagegen 3 ml Trichloressigsäure ein, so erhielt man ein klares Filtrat; deshalb wurde diese Menge bei allen Speichelwerten verwendet.

II. BESTIMMUNG DER SULFONAMIDKONZENTRATION IN PLASMAWASSER UND SPEICHEL

a) Allgemeine Versuchsbedingungen

Den Versuchspersonen wurde das Sulfonamid morgens nüchtern verabreicht, und bis zur Beendigung des Versuchs nahmen sie keine Nahrung zu sich. Vorher wurde ein Leerwert von Blut und Speichel (je 10 ml) abgenommen. Das Blut wurde durch Punktion der Cubitalvene gewonnen, durch Heparin ungerinnbar gemacht und anschließend zentrifugiert. Um möglichst gut vergleichbare Werte von Speichel und Plasma zu erhalten, wurde die Blutentnahme jeweils so in die Speichelperiode eingesetzt, daß in gleichen Zeitabständen vor und nach der Blutentnahme gleich große Mengen Speichel gesammelt wurden. Dadurch entsprach die Endkonzentration der Speichelprobe im Mittelwert der Speichelkonzentration zur Zeit der Blutentnahme. Das war deshalb wichtig, da es sich bei keiner unserer Substanzen um ein sogenanntes Langzeitpräparat handelte, so daß die Plasmakonzentration nie über längere Zeit konstant war, sondern zum Teil erheblich schwankte. Durch das angegebene Verfahren gelang es jedoch, in ausreichender Genauigkeit Bezugskonzentrationen im Plasma zu erhalten.

Sämtliche Proben wurden am Versuchstag bei Zimmertemperatur aufgearbeitet.

b) Einzelversuche

1. Sulfanilamid: Je 2 g wurden 3 Versuchspersonen gegeben und nach 2 und 3 Stunden die Konzentrationen in Plasmawasser und Speichel bestimmt:

Versuchs- person	eingee- bene Dosis (g)	Zeitpkt. d. Unter- suchung nach Einnahme in Std.	Plasma- wasser- Konzentration (µg%)	Plasma- wasser- Konzentration (µg%)	Speichel- Quotient S/Pw
1	2	2	2585	1900	2260
		3	2340	1720	1890
2	2	2	3600	2670	2745
3	2	3	3350	2480	2520
Mittelwert des Quotienten					1.082 ± 0.021

2. Sulfadiazin: Zwei Versuchspersonen erhielten je 1 g, drei Versuchspersonen je 2 g Substanz. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten nach 4, 5 und 6 Stunden.

Versuchs- person	eingee- bene Dosis (g)	Zeitpkt. d. Unter- suchung nach Einnahme in Std.	Plasma- wasser- Konzentration (µg%)	Plasma- wasser- Konzentration (µg%)	Speichel- Quotient S/Pw
1	2	5	2310	995	285
		6	2310	995	345
2	2	4	2970	1309	435
		5	3270	1450	458
3	1	6	2730	1200	411
4	1	4	1830	769	285
		5	1980	831	293
		6	1620	681	248
5	2	4	2250	969	345
		5	2390	1040	330
Mittelwert des Quotienten					0.338 ± 0.0083

3. Sulfaäthidol: Eine Versuchsperson erhielt 2 g, vier Versuchspersonen erhielten je 3 g Substanz. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach 1, 2 und 3 Stunden. Bei Versuchsperson 3 war die Plasmakonzentration nach 1 Std. noch so gering, daß im Speichel keine bestimmbareren Mengen auftraten.

Versuchs- person	eingee- bene Dosis (g)	Zeitpkt. d.Untersuchung nach Einnahme in Std.	Plasma- Konzentration	Plasma- wasser- Konzentration (µg%)	Speichel- Konzentration	Quotient S/Pw
1	3	1	15 650	601	90	0.150
		2	22 150	997	112	0.113
2	3	1	16 660	664	60	0.0903
		2	17 270	691	67.5	0.0977
3	3	1	2 520	90	---	---
		2	14 750	553	60	0.1085
4	2	1	14 600	547	90	0.164
		2	17 300	692	75	0.108
		3	15 650	601	60	0.0997
5	3	1	15 500	604	60	0.0994
		2	21 000	924	100	0.1083
		3	24 300	1120	140	0.1250
Mittelwert des Quotienten						0.115 ± 0.0062

4. Sulfacetamid: Drei Versuchspersonen erhielten je 1 g, zwei Versuchspersonen je 3 g Substanz. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach 3, 4 und 5 Stunden.

Versuchs- person	eingee- bene Dosis (g)	Zeitpkt. d.Untersuchung nach Einnahme in Std.	Plasma- Konzentration	Plasma- wasser- Konzentration	Speichel- Konzentration	Quotient S/Pw
Konzentration (µg%)						
1	3	3	3270	2535	2280	0.899
		4	2820	2170	1870	0.862
2	3	3	4770	3735	3375	0.903
		4	4250	3320	3170	0.955
3	1	3	1400	1055	970	0.920
		4	1260	940	850	0.904

Versuchs- person		Zeitpkt. d.Untersuchung nach Einnahme in Std.	Plasma- Plasma- wasser- Konzentration (µg%)	Speichel-	Quotient S/Pw	
	eingege- bene Dosis (g)					
		5	1230	916	890	0.972
4	1	3	1395	1050	945	0.900
		4	1260	940	923	0.981
		5	1110	822	758	0.922
5	1	3	1470	1110	958	0.864
		4	1320	987	854	0.866
		5	1140	845	794	<u>0.939</u>
		Mittelwert des Quotienten			0.915 ±	0.0089

5. Sulfacarbamid: Fünf Versuchspersonen erhielten je 3 g Substanz, die Konzentrationsmessungen erfolgten nach 1, 2 und 3 Stunden.

Versuchs- person	eingege- bene Dosis (g)	Zeitpkt. d.Unter- suchung nach Einnahme in Std.	Plasma- Konzentration (µg%)	Plasma- wasser- Konzentration (µg%)	Speichel- Konzentration (µg%)	Quotient S/Pw
1	3	1	1890	1653	52.5	0.0318
		2	1965	1720	60	0.0349
		3	2175	1915	75	0.0392
2	3	2	1366	1173	60	0.0511
		3	1216	1035	50	0.0478
3	3	2	2640	2315	60	0.0259
		3	2250	1980	52.5	0.0265
4	3	2	1140	969	60	0.0619
		3	1430	1235	75	0.0607
5	3	2	1290	1105	65	0.0588
		3	1140	969	30	0.0310
Mittelwert des Quotienten					0.0428	± 0.0034

c) Ergebnisse

1. Die Sulfonamidkonzentrationen im Speichel lassen sich nicht direkt zu denen im Plasmawasser in Beziehung setzen, d.h., der Speichel entspricht nicht einem Ultrafiltrat des Plasmas. Lediglich für Sulfanilamid sind die Konzentrationen in beiden wässrigen Phasen etwa gleich groß, dagegen finden sich für die anderen Sulfonamide im Speichel geringere Konzentrationen als im Plasmawasser.

2. Es ergibt sich für jedes Sulfonamid ein relativ konstanter Quotient S/P_w als Ausdruck einer festen Relation von Speichel- und Plasmawasserkonzentration. Dieses Verhältnis zeigt keine Veränderung bei

a) den verschiedenen Versuchspersonen

b) verschiedenen Speichel-Sekretionsraten, denn diese schwankten bei den einzelnen Versuchspersonen erheblich,

c) Variation der aktuellen Sulfonamidkonzentration im Plasma, die während eines Versuches bis zu 9 mg% betrug.

3. Vergleicht man die Konzentrationen der einzelnen Sulfonamide in den verschiedenen Flüssigkeiten, so ergibt sich folgende Reihe:

Plasma	Plasmawasser	Speichel
Sulfaäthidol	Sulfanilamid	Sulfanilamid
Sulfadiazin	Sulfacetamid	Sulfacetamid
Sulfanilamid	Sulfadiazin	Sulfadiazin
Sulfacetamid	Sulfacarbamid	Sulfaäthidol
Sulfacarbamid	Sulfaäthidol	Sulfacarbamid

Geordnet nach dem Quotienten S/P_w ergibt sich für den Anteil der im Plasmawasser gelösten Menge, der im Speichel erscheint, die Reihenfolge:

Sulfanilamid	1.08
Sulfacetamid	0.915
Sulfadiazin	0.338
Sulfaäthidol	0.115
Sulfacarbamid	0.043

4. Das auffälligste Ergebnis war die deutliche Diskrepanz in der Ausscheidung von Sulfacetamid und Sulfacarbamid, obwohl sich beide Sulfonamide in Struktur und Eigenschaften ähneln,

und zwar sowohl an absoluter Menge (Sulfacetamid maximal 3.37 mg%, Sulfacarbamid maximal 0.13 mg% im Speichel bei 3 g Dosis) als auch im Verhältnis Speichelkonzentration/Plasmawasserkonzentration. Zur Aufklärung dieses Sachverhaltes wurden weitere Versuche unternommen.

III. VERSUCHE ZUR KLÄRUNG DES AUFFÄLLIGEN VERHALTENS VON SULFACETAMID BEIM ÜBERTRITT IN DEN SPEICHEL

1. Theoretische Überlegungen und Versuchsanordnung

Am naheliegensten war es, aus den hohen Speichelkonzentrationen von Sulfacetamid auf eine Veränderung der Molekularstruktur zu schließen.

DOHRN und DIEDERICH (19) und LANGECKER (29) konnten einen teilweisen Abbau von Sulfacetamid zu Sulfanilamid nachweisen. Dagegen werden nach LANGECKER die anderen Sulfonamide während der Körperpassage nicht verändert. Sie fand nur eine Carbonsäureamidspaltung von Sulfacetamid, die bei Sulfacarbamid nicht auftritt; eine Sulfonsäureamidspaltung oder eine Desaminierung ließen sich überhaupt nicht nachweisen. Ein Sulfacarbamidabbau zu Sulfanilamid ist nach unseren Versuchen auch unwahrscheinlich, da die Speichelkonzentrationen nach Gabe von Sulfacarbamid sehr niedrig sind, während sie auch bei nur partieller Umwandlung in Sulfanilamid deutlich höher liegen müßten, da dieses Sulfonamid in Plasmawasserkonzentration im Speichel auftritt.

a) Es wurde mit Hilfe von Speicheluntersuchungen nach Sulfacetamidgabe geprüft, ob es zum Abbau dieses Sulfonamids während der Körperpassage kommt und welchen Grad dieser Abbau erreicht.

b) Durch Plasmauntersuchungen auf Sulfacetamidabbau wurde geprüft, wie weit der Abbau bereits im Blut vor sich geht; die Ergebnisse wurden mit denen aus dem Speichel verglichen, um eine Beteiligung der Speicheldrüse am Abbau zu erfassen.

c) In vitro wurde mit Hilfe von Inkubation sulfacetamidhaltigen Speichels untersucht, ob dieser Abbau auch im sezere-

nierten Speichel weitergeht; außerdem wurde Sulfacetamid in Pufferlösungen mit verschiedenem pH-Wert inkubiert, um festzustellen, ob eine Änderung des pH einen Einfluß auf die Spaltung ausübt.

2. Methodik

a) Dünnschichtchromatographie

10 ml Speichel oder Plasma wurden zunächst mit 1 n bzw. 1/10 n HCl auf pH 5.5 eingestellt und anschließend das Sulfonamid mit Essigester extrahiert. Der Extrakt wurde zur Trockne eingengt, in 0.5 ml Methanol gelöst und 0.2 ml auf eine mit Kieselgel G nach STAHL (E. MERCK Darmstadt) bezogene Platte aufgetragen. Das Sulfonamid läuft im ammoniakalischen System nach KALBE (26) (Isopropanol : Ammoncarbonatpuffer 3:1), Laufzeit ca. 3 Stunden. Danach wurde die Platte getrocknet, die Zone unter UV-Licht markiert, abgeschabt und mit Methanol eluiert. Das Eluat wurde eingengt und in 1 ml Methanol gelöst. Für die Sulfonamidbestimmung wurde ein entsprechender Teil der methanolischen Lösung erneut eingengt und in Wasser gelöst. Die Bestimmung erfolgte nach BRATTON und MARSHALL. Zur Identifizierung der Sulfonamide wurden die R_F -Werte der einzelnen Substanzen durch Chromatographie von nebeneinander aufgetragenen sulfonamidhaltigen Lösungen bekannter Qualität bestimmt und mit den Analysen verglichen.

b) Inkubation sulfonamidhaltiger Lösungen

Bei den anschließenden Versuchen in vitro wurde Sulfacetamid in einer Konzentration, wie sie bei unseren Humanversuchen im Blutplasma auftrat (2 mg%), in 10 ml 0.067 molarem Phosphatpuffer nach SORENSEN mit wechselndem pH (6.6, 7.4, 8.2) gelöst und bei 37°C über 2 bzw. 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die chromatographische Be-

stimmung. Außerdem wurden 10 ml Speichel (pH 6.7) mit 2 mg% bzw. 3 mg% Sulfacetamid versetzt und ebenfalls 24 Stunden inkubiert. Wiederum erfolgte die Aufarbeitung wie oben angegeben durch Chromatographie.

3. Durchführung der Versuche

a) Speichel

Vier Versuchspersonen wurde je 1 g Sulfacetamid oral verabreicht. Nach drei Stunden erfolgte die Gewinnung des Speichels. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde dieser auf eine Spaltung untersucht. Unter der UV-Lampe fanden sich zwei Sulfonamidfraktionen mit R_F -Werten von 0.78 bzw. 0.57; nach den Vorversuchen wurde die schneller laufende Fraktion als Sulfanilamid, die langsamere als Sulfacetamid identifiziert; danach erfolgte die Messung der Sulfonamidkonzentrationen der einzelnen Zonen.

Versuchsperson	Sulfonamidkonz. ($\mu\text{g}\%$)			% Sulfacetamid
	gesamt	Sulfanilamid	Sulfacetamid	
1	727	673	54	7.43
2	327	304	23	7.04
3	505	471	34	6.73
5	747	684	63	8.46
Mittelwert				7.43 ± 0.16

b) Plasma

Bei einer Versuchsperson wurde im unter a) geschilderten Versuch nach 2 und 3 Stunden zusätzlich Blut entnommen. Bei der Chromatographie wurden wiederum zwei Fraktionen mit denselben R_F -Werten wie im Speichel gefunden.

Versuchsperson	Sulfonamidkonz. ($\mu\text{g}\%$)			% Sulfacetamid
	gesamt	Sulfanilamid	Sulfacetamid	
3	782	386	396	50.6
	531	208	323	60.8

c) In vitro

In frisch gewonnenem Speichel wurde Sulfacetamid in Konzentrationen von 2 bzw. 3 mg% gelöst und über 24 Stunden inkubiert. Während bei einer Konzentration von 2 mg% nur sehr geringe Spuren einer zweiten Zone auftraten, wurde bei 3 mg% eine deutliche zweite Zone festgestellt, die auch groß genug war, um quantitativ nach BRATTON und MARSHALL bestimmt zu werden; diese zweite Zone wurde wiederum als Sulfanilamid identifiziert. Die Sulfonamidbestimmung lieferte folgende Werte:

eingesetzte Menge (mg%)	gefundenes Sulfacetamid (mg%)	gefundenes Sulfanilamid (mg%)	% Sulfanilamid
3.0	2.60	0.115	4.2

Die Phosphatpuffer wurden zum Versuch frisch hergestellt und das Sulfacetamid in den angegebenen Konzentrationen darin gelöst. Nach Überprüfung der pH-Werte wurden die Lösungen über 2 bzw. 24 Stunden inkubiert. Danach wurde die chromatographische Bestimmung durchgeführt. Weder unter dem UV-Licht, noch bei der angefügten Sulfonamidbestimmung konnte neben der Sulfacetamidzone eine weitere Zone festgestellt werden. Die gesamte wiedergefundene Menge war Sulfacetamid.

4. E r g e b n i s d e r V e r s u c h e

Die Versuche zur Spaltung des Sulfacetamids ergeben:

a) Bis zur Ausscheidung im Speichel ist das Sulfacetamid fast völlig in Sulfanilamid übergegangen. Der verbleibende Sulfacetamidrest betrug zwischen 6.7 - 8.5 % der gefundenen Gesamtmenge Sulfonamid.

b) Im Plasma ist bereits ein großer Teil des Sulfacetamids zu Sulfanilamid abgebaut. Hier finden sich noch 50 bis 60 % Sulfacetamid wieder. Dabei ist einschränkend zu berücksichtigen, daß im Plasma nur zwei Bestimmungen durchgeführt wurden. Durch dieses Ergebnis wird der Quotient S/Pw für

Sulfacetamid insofern korrigiert, als bei unseren Berechnungen für die Plasma-Eiweißbindung allein die Sulfacetamidbindung berücksichtigt wurde, während bei einem Abbau im Plasma von ungefähr 50 % zu Sulfanilamid für diese 50 % natürlich die Bindungsverhältnisse des Sulfanilamids gelten. Da die Bindungsstärke an Plasmaeiweiß für Sulfanilamid und Sulfacetamid nur wenig unterschiedlich ist, wurde diese Umrechnung nicht vorgenommen und die Ergebniswerte für "Sulfacetamid", die sowieso keine praktische Bedeutung haben, liegen um etwa 2 % zu niedrig.

c) 1. Im Speichel wurde in vitro eine geringe Spaltung des Sulfacetamids festgestellt. Allerdings war diese Spaltung nach zweistündiger Inkubation noch nicht feststellbar; erst nach 24 Stunden waren zwei Sulfonamidzonen zu erkennen. Dabei waren 4.2. % der wiedergefundenen Menge Sulfanilamid.

2. Ein Einfluß des pH-Wertes auf die Spaltung konnte in vitro nicht festgestellt werden. Weder in saurer noch in alkalischer Lösung trat bei Inkubation ein Abbau auf.

DISKUSSION

I. ÜBERLEGUNGEN ZUR SPEICHELAUSSCHIEDUNG DER SULFONAMIDE UND DEN SIE BESTIMMENDEN FAKTOREN

Das unterschiedliche Auftreten der untersuchten Sulfonamide im Speichel stellt die Frage nach einem übergeordneten Mechanismus, der für das experimentelle Ergebnis verantwortlich ist. Unsere Überlegungen müssen klären, ob die Tätigkeit der Speicheldrüse für die Resultate verantwortlich ist, und zwar

a) durch aktive Sekretion oder

b) durch die pH-Verhältnisse des Speichels

oder ob die Eigenschaften der Sulfonamide ihr Auftreten im Speichel bestimmen, ob also ihre Membrangängigkeit entscheidend für ihre Ausscheidung ist.

A. T ä t i g k e i t d e r S p e i c h e l d r ü s e

a) Unter Voraussetzung eines aktiven Transportes müßte man erwarten, daß mit Ansteigen des Plasmaspiegels der Transportmechanismus durch die Membran mehr und mehr abgesättigt wird und daß von einem bestimmten Punkt an die Speichelskonzentration im Verhältnis zum Plasmaspiegel absinkt. Weder bei unseren Versuchen noch bei denen von KILLMANN und THAYSEN, die mit teilweise weit höheren Plasmakonzentrationen arbeiteten als wir, war ein solcher Befund zu erheben; der Quotient war von der Höhe des Plasmaspiegels unabhängig. Deshalb ist die Sulfonamidausscheidung in den Speichel in Übereinstimmung mit anderen Autoren als passiv anzusehen (28, 44).

b) Der pH-Wert des Speichels liegt beim Menschen im leicht sauren Bereich. Er beeinflußt die Dissoziation der Sulfon-

amide, die schwache Säuren sind, und gewinnt damit in Verbindung mit der Sulfonamid-Dissoziation eine Bedeutung für die Ausscheidung dieser Substanzen, auf die bei der Besprechung der Sulfonamideigenschaften eingegangen wird.

Da also die Ausscheidung passiv ist, würde man erwarten, daß sich durch Diffusion ein Verteilungsgleichgewicht für die Sulfonamide einstellt zwischen den Wasserphasen der beiden Medien Blut und Speichel, so wie es WITZGALL für den ganzen Körper fordert (59). Dabei würden sich Unterschiede in den Sulfonamidkonzentrationen der Körperflüssigkeiten nur durch die unterschiedlichen Adsorptionsmöglichkeiten ergeben. Da im Speichel keine Bindung von Sulfonamid an Eiweiß auftritt, wie unsere Versuche in Bestätigung der Ergebnisse von KILLMANN und THAYSEN und RASMUSSEN ergeben haben, wäre die Speichelkonzentration mit der Plasmawasserkonzentration gleichzusetzen. Unsere Versuche zeigen, daß nur das Sulfanilamid der geforderten Verteilung nachkommt und ein Gleichgewicht erreicht, während sämtliche anderen Sulfonamide im Speichel niedrigere Konzentrationen erreichen als im Plasmawasser. Allerdings besteht zwischen dem Speichel und den übrigen Körperflüssigkeiten ein wichtiger Unterschied: Die eben geschilderten Verteilungsverhältnisse gelten nur für die Endkonzentrationen, die sich in einem geschlossenen System einstellen können. Der Speichel dagegen stellt ein offenes System dar; der Speichel und die in ihn übertretenden Substanzen fließen ständig ab, und deshalb ist ein Endgleichgewicht der gelösten Anteile in beiden Medien nicht erreichbar. Vielmehr bekommen die Eigenschaften der Sulfonamide, die sie zu schneller Passage in den Speichel befähigen, eine große Bedeutung für die Ausscheidung.

B. Eigenschaften der Sulfonamide

a) Dissoziationsgrad

Unter den Sulfonamideigenschaften, die eine schnelle Speichelpassage ermöglichen, steht an erster Stelle eine geringe Dissoziation. Bereits VONKENNEL und SCHMIDT (57) und WITZGALL (59) haben darauf hingewiesen, daß dissoziierte Sulfonamide für das Eindringen in den Liquor bzw. den Erythrocyten viel Zeit benötigen. Die endgültige Verteilung der mäßig oder überhaupt nicht dissoziierten Sulfonamide wie Sulfanilamid oder Sulfadiazin ist im Erythrocyten nach weniger als fünf Minuten erreicht, während stark dissoziierte Sulfonamide wie Sulfacarbamid erst nach mehreren Stunden das endgültige Verteilungsgleichgewicht erreichen. Da bei der kurzen Verweildauer des Speichels im Gang eine auch nur annähernd gleich große Zeitspanne bei der Speichelsekretion nicht zur Verfügung steht, muß die Konzentration der dissoziierten Sulfonamide im Speichel im Verhältnis zur Plasmawasserkonzentration geringer sein als die der undissoziierten. Ein Vergleich unserer Quotienten mit den pK_a -Werten der Sulfonamide bestätigt diese Überlegung: Je niedriger der pK_a -Wert der Sulfonamide ist, desto niedriger wurde auch der Quotient S/P_w gefunden. (Das Sulfacetamid fällt hierbei aus der Reihe. Da es im Körper abgebaut wird, gelten die hier angestellten Überlegungen für dieses Sulfonamid nicht. Es wird in Teil II der Diskussion besprochen).

Für die vorgebrachte Ansicht sprechen Versuche von KILLMANN und THAYSEN, die im Speichel dieselbe Parallelität feststellten ebenso wie SISODIA und STOWE (52) und AUSTIN (5) für die Milcn. Die Abhängigkeit der Ausscheidung von der Speichelsekretionsrate wurde für Nichtelektrolyte mehrfach festgestellt (1, 11), wenn auch sowohl KILLMANN und THAYSEN als auch RASMUSSEN einen Zusammenhang von Ausscheidung und Speichelsekretionsrate für Sulfonamide ablehnen. Nicht erklärbar mit unserer Ansicht sind die Ergebnisse von RASMUSSEN, der im Speichel höhere Sulfonamidkonzentrationen fand als im Plasma, was nach dem bisher Vorgetragenen nicht möglich wäre.

Eine Berücksichtigung des Speichel-pH führt dabei zu weiteren Überlegungen: Da die Sulfonamide teilweise dissoziierte Verbindungen sind, wird für sie der pH-Wert der Medien, in denen sie vorliegen, bedeutsam. Eine Änderung des pH führt zu einer Änderung der Dissoziation. Der pH des Speichels hat deshalb eine Bedeutung für die Ausscheidung der Sulfonamide:

Die Membran ist nur für den undissoziierten Anteil eines Sulfonamids durchlässig. Ist das Sulfonamid praktisch völlig undissoziiert - wie in unserem Fall das Sulfanilamid - so ändert sich daran beim Übertritt in den Speichel nichts; durch die Membran schnell hindurchtretend erreicht das Sulfonamid ein Gleichgewicht von $S/P_w = 1$. Ist das Sulfonamid bei Blut-pH jedoch teilweise dissoziiert, so wird durch den Übertritt in den sauren Speichel der Dissoziationsgrad verändert. Der ionisierte Anteil nimmt ab. Da nur der undissoziierte Anteil des Sulfonamids die Membran passieren kann, kann sich ein Gleichgewicht zwischen Speichel und Plasmawasser auch nur für die undissoziierten Anteile auf beiden Seiten der Membran einstellen; diese wiederum stehen jeweils mit dem ionisierten Anteil auf ihrer Seite der Membran im Gleichgewicht. Da aber gemäß dem pH-Wert der dissoziierte Anteil im Speichel abgenommen hat, muß im Gleichgewicht die Sulfonamid-Gesamtkonzentration im Speichel niedriger sein als im Plasmawasser. Der Gleichgewichtszustand für die teilweise dissoziierten Sulfonamide verschiebt sich, und der Quotient S/P_w nimmt ab. Die Größe des Quotienten im Gleichgewicht läßt sich bei alleiniger Abhängigkeit der Ausscheidung vom Dissoziationsgrad berechnen nach der Formel:

$$\frac{\text{Konzentration Speichel}}{\text{Konzentration Plasmawasser}} = \frac{1 + 10^{(pH_S - pK_a)}}{1 + 10^{(pH_P - pK_a)}}$$

(DAVSON und DANIELLI 1943, zit. nach RASMUSSEN. 44)

Während bei allen übrigen Körperräumen dieses Konzentrati-

onsverhältnis für alle Sulfonamide = 1 ist, wird beim Speichel durch den veränderten pH-Wert der Quotient verändert. Dieser theoretische Quotient ist für die einzelnen Sulfonamide vom pK_a -Wert abhängig. Für die undissoziierten Sulfonamide ist er, wie oben ausgeführt, über große pH-Bereiche des Speichels = 1. Die theoretischen Quotienten gelten nur für einen Gleichgewichtszustand. Dieser kann aber in unserem Fall nicht erreicht werden, da in diesem offenen System der Speichel dauernd abfließt und die Sulfonamide eine gewisse Zeit benötigen, um die Membran zu passieren. So liegen die experimentellen Quotienten meist unter den theoretischen, wobei die Abweichung vom theoretischen Wert um so größer ist, je stärker die Dissoziation des Sulfonamids ist; denn in demselben Maße wird die Ausscheidung in den Speichel zunehmend behindert.

Für diese Ansicht sprechen die Versuchsergebnisse von RASMUSSEN, der im alkalischen Wiederkäuerspeichel (pH 8,2) einige Sulfonamide mit pK_a -Werten unter 8.0 konzentriert wiederfand, darunter das Sulfadiazin mit einem S/Pw von über 3.0. Sulfanilamid, das auch bei pH 8.2 nicht nennenswert dissoziiert ist, hatte einen Quotienten von 1 und das stark dissoziierte Sulfacetamid einen S/Pw von 0.1; das bedeutet nach unseren Überlegungen: Für Sulfanilamid spielen sowohl pH als auch ständiger Speichelfluß keine die Ausscheidung beschränkende Rolle; es erreicht das Gleichgewicht. Die übrigen Sulfonamide sind von beiden Faktoren abhängig, und zwar nimmt die Bedeutung des Speichelabflusses für die Ausscheidung mit steigender Dissoziation zu, so daß mäßig dissoziierte Sulfonamide wie Sulfadiazin zwar noch im alkalischen Speichel konzentriert werden, stark dissoziierte Sulfonamide wie Sulfacetamid jedoch auch hier nur in ganz geringer Menge im Speichel erscheinen, da ihre Ausscheidung zu viel Zeit in Anspruch nimmt.

Allerdings bedürfen die Ergebnisse von RASMUSSEN der experimentellen Nachprüfung am Menschen, dessen Speichel-pH man zu diesem Zweck verändern müßte.

b) Weitere Eigenschaften der Sulfonamide

Für eine gute Passage durch Schrankenmembranen sind nach Literaturangaben gute Lipoidlöslichkeit, kleines Molekulargewicht, große Grenzflächenaktivität nützlich. Den Einfluß der Lipoidlöslichkeit auf die Sulfonamidausscheidung beschrieb RASMUSSEN; die Grenzflächenaktivität hat nach WITZGALL einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Membranpassage, der die Penetrationsgeschwindigkeit von Sulfaäthidol und Sulfacetamid an der Erythrocytenmembran verglich. Bei der Speichelausscheidung von Sulfonamiden spielen diese Faktoren jedoch augenscheinlich eine untergeordnete Rolle. Vergleicht man unsere Quotienten mit diesen Eigenschaften der Sulfonamide, so ergibt sich keine so gute Parallelität wie bei den pK_a -Werten, deren Einfluß man als dominierend betrachten muß: Sulfanilamid wird trotz geringer Lipoidlöslichkeit auf Grund seines völlig undissoziierten Vorliegens am schnellsten ausgeschieden und erreicht im Speichel und Plasmawasser gleiche Konzentrationen. Sulfadiazin, von den übrigen Sulfonamiden am wenigsten dissoziiert und gut lipoidlöslich, wird trotz höheren Molekulargewichtes besser ausgeschieden als die restlichen Sulfonamide, während Sulfacarbid, das neben seiner starken Dissoziation auch noch praktisch lipoidunlöslich ist, trotz seines geringen Molekulargewichtes nur in äußerst geringer Konzentration im Speichel erscheint. Sulfaäthidol hat von den hier verwendeten Sulfonamiden bei weitem die größte Grenzflächenaktivität, außerdem die beste Lipoidlöslichkeit. Dennoch wird es nur in geringer Menge in den Speichel ausgeschieden, da seine Dissoziation stark ist.

Nicht in Einklang mit diesen Überlegungen stehen die Ausführungen von TROSCHIN (56). Dieser lehnt jegliche "Membranen" ab und vertritt die sogenannte "Sorptions-theorie", nach der die Permeabilität der Zelle für eine Substanz allein abhängt von ihrer Löslichkeit im Protoplasma und von der adsorptiven Bindung und chemischen Bindung an die Kolloide der Zelle. Dabei spielt bei niedrigen Konzentrationen der Substanz im Außenmedium die Bindung die entschei-

dende Rolle für die Verteilung, während bei hohen Konzentrationen die Löslichkeit den Gehalt der Zelle begrenzt; d.h., daß sich die Gleichgewichtskonzentration einer Substanz nach ihrer jeweiligen absoluten Konzentration ändert: Bei niedrigen Umgebungskonzentrationen ist im Gleichgewicht die Konzentration in der Zelle höher als außerhalb, bei hohen Umgebungskonzentrationen umgekehrt. In physiologischen Konzentrationen spielen demnach die adsorptive und chemische Bindung einer Substanz die entscheidende Rolle für die Verteilung im Körper. Für diesen Einfluß der Bindung besteht nach unseren Versuchen kein Anhalt. Man würde nach dieser Theorie erwarten, daß am schnellsten das Sulfaäthidol die Speicheldrüse passieren kann, da es die bei weitem stärkste Eiweißaffinität hat; so konnte ja auch WITZGALL feststellen, daß beim Erythrocyten das Sulfaäthidol am schnellsten die Membran passiert. Das ist aber hier nicht der Fall, sondern das Sulfanilamid, dessen Grenzflächenaktivität längst nicht so ausgeprägt ist, wird in weit größerer Menge ausgeschieden als Sulfaäthidol. Außerdem ist die Ausscheidungsrate sämtlicher untersuchter Substanzen unabhängig von ihrem Plasmaspiegel.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Die Sulfonamidausscheidung in den Speichel gehorcht im Prinzip denselben Gesetzen wie die Verteilung in anderen Körperräumen. Allerdings nimmt der Speichel eine Sonderstellung ein, da die Speichelausscheidung ein offenes System darstellt, wodurch es nur für bestimmte Substanzen zur Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Speichel und Plasmawasser kommt. Zwei Faktoren beeinflussen die meßbaren Speichelkonzentrationen und die Quotienten S/P_w : der ständige Abfluß und der gegenüber dem Blut veränderte pH des Speichels. Durch diese beiden Faktoren wird für teilweise dissoziierte Sulfonamide im menschlichen Speichel

- 1) das Gleichgewicht mit dem Plasmawasser verändert im Sinne einer Erniedrigung des Quotienten S/P_w und
- 2) die Einstellung dieses Gleichgewichtes verhindert und zwar um so stärker, je niedriger die Diffusibilität der

Sulfonamide ist. Sichtbares Ergebnis dieser Einwirkungen ist ein Abnehmen der Quotienten S/Pw mit sinkendem pK_a der Sulfonamide.

II. ÜBERLEGUNGEN ZUR METABOLISIERUNG

Daß Sulfonamide in ihrer Struktur verändert werden können, ist seit langem bekannt. Erst kürzlich haben wieder BÜTTNER und PORTWICH (15) eine Spaltung von Sulfonamiden in vitro durch Sauerstoffzufuhr zu Sulfonamidlösungen nachweisen können. Von den in unseren Versuchen verwendeten Sulfonamiden ist nur für Sulfacetamid eine Spaltung bekannt, und zwar eine Carbonsäureamidspaltung, die von DOHRN und DIEDERICH (19) beschrieben und von LANGECKER (29) bestätigt worden ist; andere Abbauvorgänge spielen sich nach LANGECKER im Körper nicht ab. Der Sulfacetamidabbau war bereits nach unseren ersten Versuchen als wahrscheinlich anzusehen, da ein S/Pw-Quotient von 0.9 im menschlichen Speichel für ein Sulfonamid mit den Eigenschaften des Sulfacetamids nicht möglich ist, während ein stärkerer Abbau zu Sulfanilamid diesen Wert erklären kann. Der chromatographisch bewiesene Abbau von Sulfacetamid war mit über 90% gefundenem Sulfanilamid weit höher als in der Literatur beschrieben. Das Sulfacetamid ist eine sehr instabile Verbindung und zerfällt bereits bei längerem Stehen an der Luft in Sulfanilamid und Essigsäure, was man an dem charakteristischen Geruch der Essigsäure feststellen kann. Nach unseren Versuchen ist es wahrscheinlich, daß im Körper ein großer Teil bereits zwischen der Aufnahme und dem Erscheinen der Substanz in der Blutbahn gespalten wird, ein nicht geringer Teil aber während der Passage durch die Speicheldrüse; denn wenn auch von uns nur zwei Versuche in dieser Richtung durchgeführt wurden, so haben sie doch gezeigt, daß der Sulfacetamidabbau

im Plasma bei weitem noch nicht so fortgeschritten war, wie er schließlich im Speichel gemessen wurde. Andererseits ist eine weitergehende Spaltung im Speichel nach der Sekretion, wenn überhaupt, dann nur in äußerst geringem Maße möglich, wie unsere Versuche nahelegen. Die Speicheldrüse scheint also an der Sulfacetamidspaltung beteiligt zu sein. Dabei ist die Parallele zum Cortisolabbau in der Speicheldrüse interessant.

Ein nicht der Spaltung unterliegendes Sulfacetamid würde im Speichel in ähnlich geringer Menge auftreten wie das für Sulfacarbamid gefunden wurde, da es wie dieses stark dissoziiert und praktisch nicht lipoidlöslich ist.

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen stehen die Ergebnisse von RASMUSSEN, bei dessen Versuchen keine nennenswerten Abbauvorgänge von Sulfacetamid auftraten, denn sonst wäre für S/Pw kein so geringer Wert möglich, wie er ihn experimentell fand, nämlich 0.1. Es finden sich in seiner Arbeit auch keinerlei Notizen zu diesem Thema. Da der alkalische pH des Speichels in seinen Versuchen an Wiederkäuern den entscheidenden Unterschied zu unserer Versuchsanordnung darstellte, lag es nahe zu untersuchen, ob der pH-Wert des Speichels einen Einfluß auf die Spaltung von Sulfacetamid ausübt, in dem Sinne, daß im leicht sauren Bereich von pH 6.7 die Spaltung stärker ist als im basischen von pH 8.2. Die zu diesem Zweck durchgeführten Versuche führten dabei zu keiner Klärung, denn in vitro trat auch nach 24-stündiger Inkubation bei keinem der untersuchten pH-Werte eine Spaltung auf. Das bedeutet allerdings lediglich, daß mit unserer Methode keine Befunde über eine pH-Abhängigkeit der Spaltung zu erheben sind. Diese Frage muß demnach offen bleiben; zu einer Klärung würde man Humanversuche benötigen, im Verlauf derer der pH des Speichels verändert werden müßte. Das aber war in unserer Versuchsanordnung nicht möglich.

III. BRAUCHBARKEIT DER SPEICHELKONZENTRATIONSBESTIMMUNG ZUR ABSCHÄTZUNG DER BIOLOGISCH AKTIVEN FRAKTION

a) S u l f o n a m i d e

Unsere Versuche geben recht gute Anhaltspunkte für diese Fragestellung. Die Stärke der Plasma-Eiweißbindung spielt keine Rolle für die Ausscheidung im Speichel. Dagegen hängt für die Sulfonamide die gute Diffusibilität weitgehend ab von dem Grad ihrer Dissoziation. Sind sie völlig undissoziiert, werden sie so schnell in den Speichel ausgeschieden, daß sie in Speichel und Plasmawasser gleiche Konzentrationen erreichen. Damit ist für diese Substanzen eine Bestimmung der Plasmawasserkonzentration aus der Speichelkonzentration möglich. Bei den übrigen Sulfonamiden verhindert die Dissoziation ein schnelles Eindringen in den Speichel und damit die Einstellung eines Gleichgewichtes; die theoretischen Quotienten sind demnach wertlos. Allerdings deutet die geringe Streuung unserer Ergebnisse an fünf Versuchspersonen darauf hin, daß die experimentellen Quotienten der einzelnen Substanzen bei einigermaßen gleichem pH auch bei verschiedenen Versuchspersonen verhältnismäßig konstant sind. Nach unseren Versuchen scheint es möglich, für jeden betroffenen teilweise dissoziierten Stoff annähernd die Plasmawasserkonzentration aus der Speichelkonzentration schätzen zu können, nachdem der Quotient einmal bestimmt wurde. Vorher mußte allerdings festgestellt werden, ob das untersuchte Sulfonamid während der Körperpassage Abbauvorgängen unterliegt. Ist dies der Fall, so läßt die Speichelkonzentration keine Rückschlüsse auf die biologisch aktive Fraktion zu.

b) A n d e r e S u b s t a n z e n

Auch hier ist die wichtigste Differenzierung zwischen den verschiedenen Stoffen in dem Grad der Dissoziation zu su-

chen. Für teilweise dissoziierte Substanzen wie z.B. verschiedene Barbiturate scheinen die Ausscheidungsverhältnisse dieselben zu sein wie für teilweise dissoziierte Sulfonamide (44). Völlig undissoziierte und kleinmolekulare Substanzen wie z.B. Harnstoff werden anscheinend ebenso gut ausgeschieden wie Sulfanilamid (1). Dagegen kann man aus unseren Versuchen nicht ableiten, wie die Ausscheidungsverhältnisse bei solchen Nichtelektrolyten sind, die ein deutlich höheres Molekulargewicht haben als unsere Testsubstanzen und bei denen nach BURGEN (11) die Lipoidlöslichkeit für die Schnelligkeit der Ausscheidung verantwortlich ist. Wenn man außerdem berücksichtigt, daß z.B. Cortisol in der Speicheldrüse abgebaut wird, so erscheint es unumgänglich, für jede interessierende Substanz zunächst den Quotienten S/P_w zu bestimmen, ehe man Aussagen darüber machen kann, wie weit die Speichelkonzentration Rückschlüsse auf die Plasmawasserkonzentration - und damit auf die biologisch aktive Fraktion - zuläßt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Ausscheidung von fünf Sulfonamiden in den menschlichen Speichel untersucht. Die Speichelkonzentration wurde mit der Konzentration im Plasmawasser verglichen und die Art der Ausscheidung im Vergleich zu anderen Körperräumen betrachtet. Die für die Speichelausscheidung der Sulfonamide verantwortlichen Faktoren wurden diskutiert. Das Verhältnis der Konzentrationen in Speichel und Plasmawasser betrug für Sulfanilamid 1.08, Sulfacetamid 0.915, Sulfadiazin 0.338, Sulfaäthidol 0.115, Sulfacarbamid 0.043. Damit wurde gezeigt, daß es für bei Blut-pH dissoziierte Sulfonamide nicht möglich ist, ein Gleichgewicht zwischen beiden Medien zu erreichen. Die Gründe dafür liegen im dauernden Abfluß und im pH-Wert des Speichels. Die Diffusibilität der Sulfonamide, die von Dissoziationsgrad, Lipoidlöslichkeit und Molekulargewicht abhängt, erhält damit entscheidende Bedeutung für die Höhe der Sulfonamidausscheidung. Sulfacetamid wird im Körper abgebaut. Die Verseifung wurde zunächst aus dem hohen Quotienten S/Pw geschlossen und danach experimentell gesichert. Sie betrug im Speichel zwischen 91 und 94% des Sulfonamids. Es wurde die Vermutung geäußert, daß die Speicheldrüse an dem Abbau beteiligt ist. - Die Modellfunktion der Sulfonamide in Bezug auf die Abschätzung der biologisch aktiven Fraktion aus der Speichelkonzentration wurde diskutiert.

L I T E R A T U R

1. ALBRECHTSEN, S.R., J.H. THAYSEN:
Excretion of urea by the human parotid gland.
Scand. J. Clin. and Lab. Invest. 7, 231-238 (1955)
2. ALEXANDER, F., M.W. HORNER, M.S. MOSS:
The salivary secretion and clearance in the horse
of chloral hydrate and its metabolites.
Biochem. Pharmacol. 16 (7), 1305 (1967)
3. AMBERSON, W.R., R. HÖBER:
The permeability of mammalian salivary gland for
organic non-electrolytes.
J. cell. comp. Physiol. 2, 201-221 (1932)
4. ANTON, A.H.:
A drug-induced change in the distribution and renal
excretion of sulfonamide.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 134, 291-303 (1961)
5. AUSTIN, F.H.:
Absorption, distribution, and excretion of sulfon-
amides in ruminants.
Federation Proceedings 26 (4), 1001-1005 (1967)
6. BENNHOLD, H., OTT, H., M. WIECH:
Über den Bindungsunterschied lebergängiger und nieren-
gängiger Substanzen an die Serumweißkörper.
Dtsch. Med. Wschr. 75, (1), 11-15 (1950)
7. BETHELL, A.N., D. MURPHY, H.F. WEST:
Use of ^3H in study of the metabolism of cortisol
and its analogs.
Strahlentherapie Sonderbände 60, 356-360 (1965)
8. BOGER, W.P.:
The diffusion of sulfonamides into the cerebro-spinal
fluid: a comparative study.
Antibiotic Med. and Clin. Therapy 6, 32-40 (1959)
9. BORZELLECA, J.F., C.H. DOYLE:
Excretion of drugs in saliva, salicylate, barbiturate,
sulfanilamide.
Journal of Oral Ther. and Pharm. 3 (2), 104-111 (1966)
10. BRATTON, A.C., E.K. MARSHALL:
A new coupling component for sulfanilamide
determinations.
J. biol. Chem. 128, 537-550 (1939)

11. BURGEN, A.S.V.:
The secretion of non-electrolytes in the parotid saliva.
J. cell. comp. Physiol. 48, 113-138 (1956)
12. BURGEN, A.S.V.:
Kinetic methods for the study of salivary secretions: their scope and limitations.
Proc. Intern. Conf. on "Salivary Glands, Their Secretion", Seattle 1962 (Publ. 1964) S. 197-215
13. BURGEN, A.S.V., P. SEEMAN:
The role of the salivary duct system in the formation of the saliva.
Can. J. Biochem. and Physiol. 36, 119-143 (1958)
14. BÜNGER, P., G. KOCH:
Klinische Untersuchungen mit 2-Sulfanilamido-5-methoxy-pyrimidin.
Arzneim. Forsch. 11 (8), 726-736 (1961)
15. BÜTTNER, H., F. PORTWICH:
Stabilitätsuntersuchungen an Sulfonamiden.
Arzneim. Forsch. 17, 809 (1967)
16. COATS, D.A., D.A. DENTON, J.R. GODING, R.D. WRIGHT:
Secretion by the parotid gland of the sheep.
J. Physiol. 131, 13-31 (1956)
17. DETTLI, L., M. BAUR, P. SPRING:
Über die Eiweißbindung der Sulfonamide in vitro und in vivo.
Chemotherapia 6, 196-205 (1963)
18. DOE, R.P., H.H. ZINNERMAN, E.B. FLINK, R.A. ULSTROM:
Significance of the concentration of non-protein-bound plasma-cortisol in normal subjects, cushing's syndrome, pregnancy, and during estrogen therapy.
J. clin. Endocrin. 20, 1484 (1960)
19. DOHRN, M., P. DIEDERICH:
Albucid, ein neues Sulfanilsäurederivat.
Münch. med. Wschr. (1938), 2017
20. FICKLING, B.W., PINCUS, P., B. BOYD-COOPER:
M. & B. 693 in the saliva.
The Lancet (1939), 1310-1311
21. FUNK, K.F., W. OELSSNER:
Zur Bestimmung des Eiweißadsorptionsfaktors von Chemotherapeutika für Dosierungsberechnungen.
Chemotherapia 10 (4), 205-216 (1966)

22. FUST, B., E. BOHNI, R.J. SCHNITZER, J. RIEDER,
Th. STRULLER:
Experimentelle und klinische Daten über Madribon.
Antibiotica et Chemotherapia 8, 32-53 (1960)
23. GOLDSWORTHY, P.D., R.B. AIRD, R.A. BECKER:
The blood brain barrier - the effect of acidic
dissociation constant on the permeation of certain
sulfonamides into the brain.
J. Cellular. Comp. Physiol. 44, 519-526 (1954)
24. GREAVES, M.S., H.F. WEST:
Cortisol and Cortison in saliva during pregnancy.
J. Endocrinolog. 26, 189-195 (1963)
25. KAKEMI, K., T. ARITA, S. MURANISHI:
Absorption and excretion of drugs XXV. Mechanisms
of rectal absorption of sulfonamides.
Chem. Pharm. bull. 13 (7), 861-869 (1965)
26. KALBE, H.:
Papierchromatographie aliphatischer Dicarbonsäuren.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 297, 19 (1954)
27. KATZ, F.H., I.L. SHANNON:
Identification and significance of parotid fluid
corticosteroids.
Acta Endocrinolog. 46 (3), 393-404 (1964)
28. KILLMANN, S.A., J.H. THAYSEN:
The permeability of the human parotid gland to a
series of sulfonamide compounds, PAH, and Inulin.
Scand. J. Clin. and Lab. Invest. 7, 86-91 (1955)
29. LANGECKER, H.:
Über das Schicksal der Sulfonamide im Organismus.
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 211, 367-384 (1950)
30. LANGECKER, H., E. SCHULZE:
Die Verteilung von Sulfanilsäure, Sulfanilamid und
Sulfacarbamid auf die Phasen des Blutes, Liquor,
Kammerwasser und Pericardflüssigkeit beim nieren-
losen Hund.
Arch. exper. Path. u. Pharmacol. 221, 160-165 (1954)
31. LANGLEY, L.L., R.S. BROWN:
Stop flow analysis of ionic transfer in the dog
parotid gland.
Am. J. Physiol. 199, 59-62 (1960)
32. LANGLEY, L.L., O.R. GRIMES, jr., D.F. COCKRELL, jr.:
Secretion of magnesium by dog parotid gland.
Am. J. Physiol. 202, 707-710 (1962)

33. LANZENDORFER, W.:
Ergebnisse experimenteller Untersuchungen über die
Ausscheidung von Sulfonamiden mit der Muttermilch.
Klin. Wochenschr. 31, 426-428 (1953)
34. LITCHFIELD, J.T., jr.:
Laboratory experiences with sulfamethoxypyridazine.
Antibiotica et Chemotherapia 8, 2-16 (1960)
35. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, R.J. RANDALL:
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
36. LUNDBERG, A.:
Anionic dependence of secretion and secretory
potentials in the perfused sublingual gland.
Acta Physiol. Scand. 40, 101-112 (1957)
37. MASHITA, T.:
Mechanism of action of chemotherapeutics in vivo IV.
Concentration of sulfathiazol in the inflammatory
part of the lung in experimental lobar pneumonia in
the rabbit.
Nisshin Igaku 37, 91-95 (1950)
38. Mc MANUS, E.C., S.F. SCHEIDY, E.K. TILLSON, A.A. PITT,
R.L. KEMP:
Distribution of sulfamerazine and sulfamethazine
between blood and cerebrospinal fluid in calves.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 115, 253-256 (1949)
39. NAKAYAKI, M., N. KOGA, H. TEREDA:
Physicochemical studies on the binding of chemicals
with proteins II. The mechanism of binding of
several sulfonamides with serum albumin.
Yakugaku Zasshi 84 (6), 516-521 (1964)
40. PAAR, G.E., R.Y. CANNON, G.E. HAWKINS:
Secretion of sulfonamides in milk following intra-
mammary, oral, and parenteral administrations.
J. Dairy Sci. 47 (3), 251-253 (1964)
41. RALL, D.P., E. MOORE, N. TAYLOR, and C.G. ZUBROD:
The blood-cerebrospinal fluid barrier in man.
Arch. Neurol. 4, 318 (1961)
42. RALL, D.P., I.R. STABENAU, C.G. ZUBROD:
Distribution of drugs between blood and cerebrospinal
fluid: general methodology and effect of pH gradients.
J. Pharmacol. 125, 185-193 (1959)
43. RASMUSSEN, F.:
Mammary excretion of sulfonamides.
Acta Pharmacol. Toxicol. 15, 139-148 (1958)

44. RASMUSSEN, F.:
Salivary excretion of sulfonamides and barbiturates
by cows and goats.
Acta Pharmacol. Toxicol. 21 (1), 11-19 (1964)
45. SCHANKER, L.S.:
Penetration of drugs into the central nervous system.
Uptake Distribution Anesthetic Agents, Conf.
New York 1962 (Publ. 1963) S. 158-167
46. SCHIPPER, I.A., D.F. EVELETH:
Rates and routes of sulfonamide excretion in the cow I.
Milk levels following single iv. and oral administration.
Am. J. Vet. Research 20, 714-717 (1959)
47. SCHOLTAN, W.:
Die Bindung der Langzeitsulfonamide an die Eiweiß-
körper des Serums.
Arzneim. Forsch. 11 (8), 707-720 (1961)
48. SCHOLTAN, W.:
Über die Eiweißbindung von Langzeitsulfonamiden.
Chemotherapie 6, 180-195 (1963)
49. SHANNON, I.L., F.H. KATZ:
Corticosteroids in human parotid fluid following
oral hydrocortison dosage.
U.S. Dept. Com. Office Tech. Serv. AD 403, 380, 3pp
(1963)
50. SHANNON, I.L., J.R. PRIGMORE:
Effects of urea dosage on urea correlations in human
parotid fluid and blood serum.
Arch. Oral Biol. 5, 161-167 (1961)
51. SHANNON, I.L., J.R. PRIGMORE, W.A. GIBSON:
Parotid fluid steroid response to graded dosis of
corticotropin.
U.S. Dept. Com. Office Tech. Serv. AD 415, 273, 3pp
(1963)
52. SISODIA, C.S., C.M. STOWE:
Mechanism of drug secretion into bovine milk.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 111 (2), 650-661 (1964)
53. SISODIA, C.S., C.M. STOWE:
Mechanism of excretion of sulfonamides into bovine
milk.
Indian vet. J. 41 (11), 711-719 (1964)
54. STREAN, L.P.:
Variation in salivary levels of 17-hydroxycortico-
steroids as an index of adrenocortical activity and
circulating corticosteroids.
N.Y. State Dental J. 26, 368-370 (1960)

55. TOYOKI, M.:
Role of the striated part of the salivary gland in
ion excretion by saliva.
Nippon Seirigaku Zasshi 24, 553-568 (1962)
56. TROSCHEIN, A.S.:
Das Problem der Zellpermeabilität.
VEB Gustav-Fischer Verlag, Jena 1958
57. VONKENNEL, J., W. SCHMIDT
Die Permeabilität der Blut-Liquor-Schranke für
Sulfonamide.
Klin. Wochenschr. 18, 150-153 (1939)
58. WALTER, A.M.:
Bakteriostatische Wirksamkeit und Pharmakodynamik
der neuen Sulfonamide.
Antibiotica et Chemotherapia 8, 54-82 (1960)
59. WITZGALL, H.:
Die Verteilung von körperfremden Stoffen im Blut
und ihr Einfluß auf die Pharmakodynamik.
Habil. Schrift Berlin 1951
60. WITZGALL, H.:
Die Blut-Liquorverteilung von Arzneimitteln an dem
Beispiel der gebräuchlichsten Sulfonamide.
Ärztl. Wschr. 8 (27), 643-645 (1953)
61. WITZGALL, H., H. BOYENS:
Die Bedeutung der Bindung an Albumin, Körperzellen
und Bakterien für Pharmakodynamik und Wirkung von
Arzneistoffen.
Arch. int. Pharmacodyn. 148, 511-535 (1964)
62. WÖHLER, F., W. OTTE, H. JUNG:
Die Bindung des 2-Sulfanilamido-5-methoxy-pyrimidins
an Eiweiß und seine Spiegel in Serum, Geweben,
Liquor und Galle.
Arzneim. Forsch. 11, 736-739 (1961)
63. WÖHLER, F., L. SPECKMANN:
Über Eiweißbindung, Blut-, Liquor- und Gewebsspiegel
neuer Sulfonamide.
Arzneim. Forsch. 10 (11), 859-869 (1960)
64. YOSHIMURA, H., T. INOUE, T. FUJIMOTO, M. TOYOKI:
Mechanism of salt secretion through the salivary
gland.
Seitai No Kagaku 11, 288-292 (1960)

65. YOSHIMURA, H., T. INOUE, Y. IMAI, F. YOSHIMURA:
Mechanism of salivary secretion.
Japan. J. Physiol. 12, 467-483 (1962)
66. ZAFIR, M.:
Treatment of eye diseases by oral administration of
sulfonamides: Donnan equilibrium as a basis for
understanding the phenomenon and a factor for the
selection of sulfonamides.
Folia Pharm. 5, 598-603 (1963)

A N H A N G

ABBILDUNG 1

Eichkurven der
Sulfonamide

- 1 Sulfanilamid
- 2 Sulfacetamid
- 3 Sulfacarbamid
- 4 Sulfadiazin
- 5 Sulfaäthidol

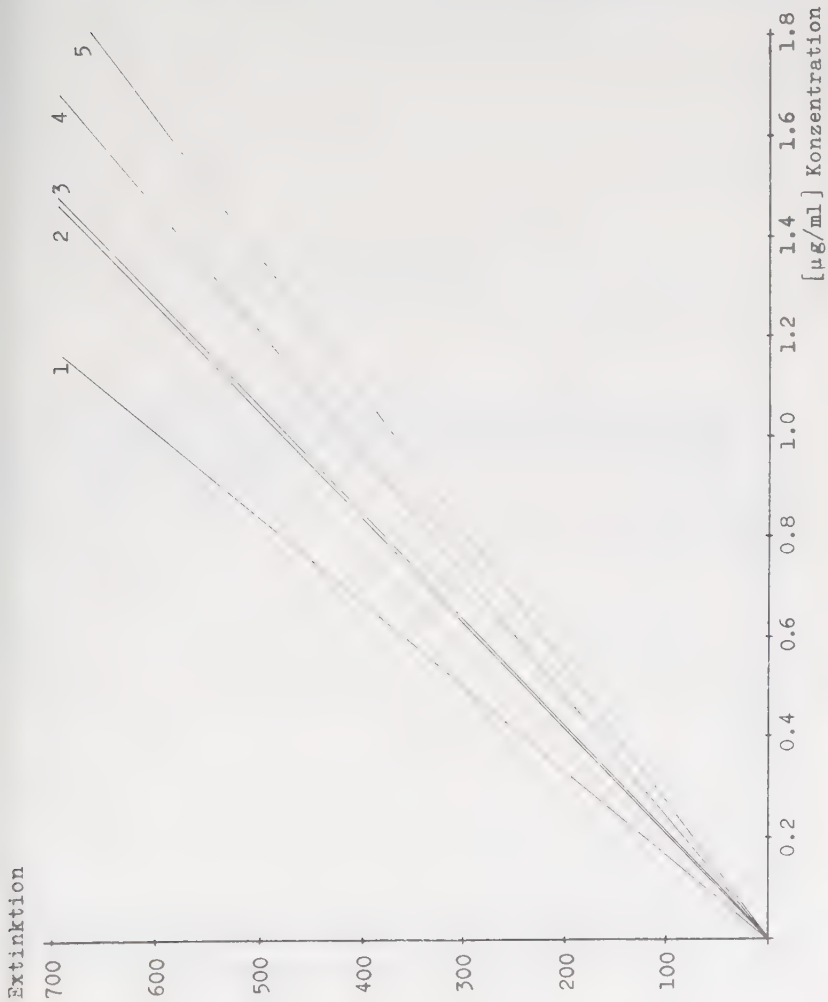
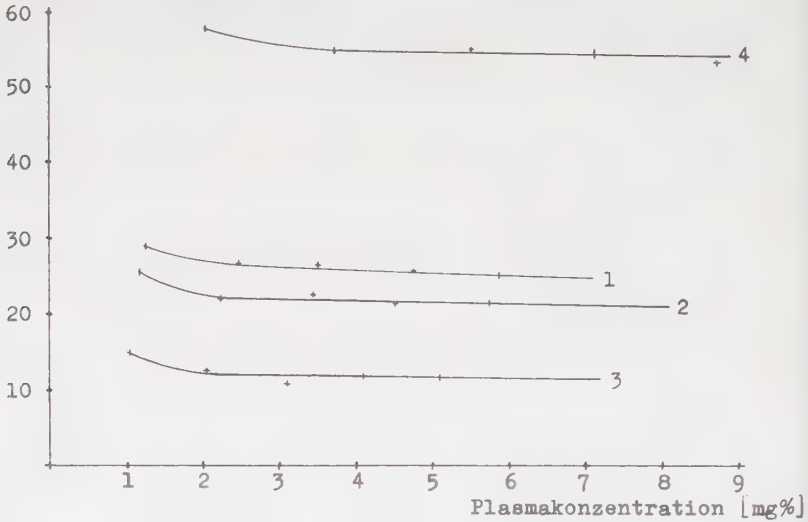


ABBILDUNG 2

Anteil des am Plasmaeiweiß gebundenen
Sulfonamids in Abhängigkeit von der
Plasmakonzentration

- 1 Sulfanilamid
- 2 Sulfacetamid
- 3 Sulfacarbamid
- 4 Sulfadiazin
- 5 Sulfaäthidol

Anteil
gebundenes Sulfonamid [%]



Anteil
gebundenes Sulfonamid [%]

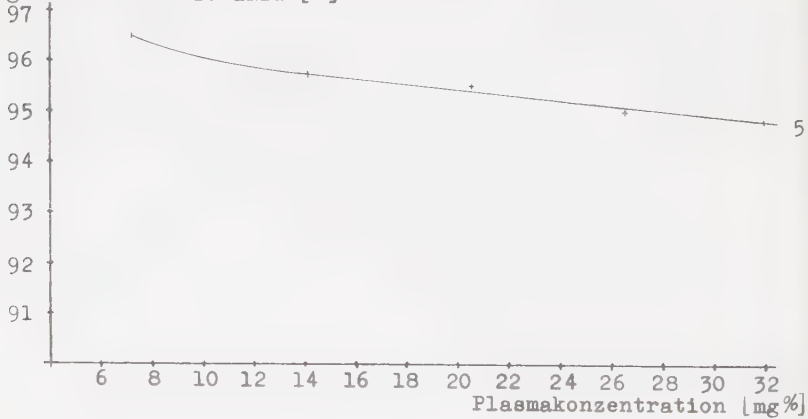
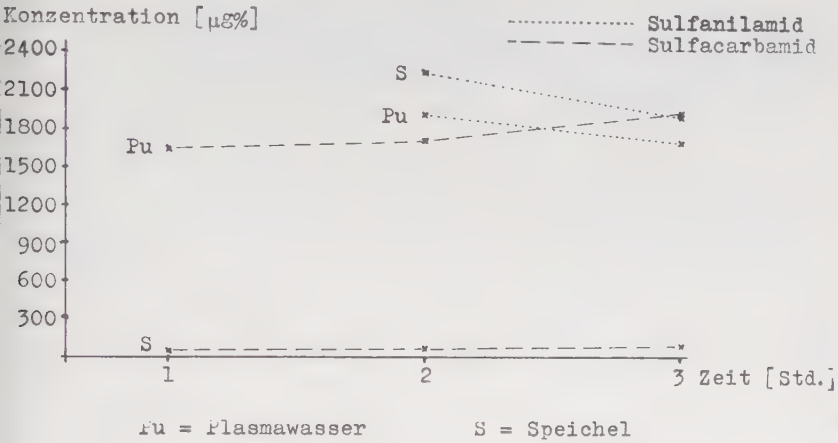


ABBILDUNG 3

Sulfonamid-Konzentrationen [$\mu\text{g}\%$] in Blutwasser und Speichel in den ersten drei Stunden nach Einnahme von 2 g Sulfanilamid bzw. 3 g Sulfacarbamid (Patient Nr. 1)



Sulfonamid-Konzentrationen [$\mu\text{g}\%$] in Blutwasser und Speichel in den ersten drei Stunden nach Einnahme von je 1 g Sulfacetamid oder Sulfadiazin bzw. 2 g Sulfaäthidol (Patient Nr. 4)

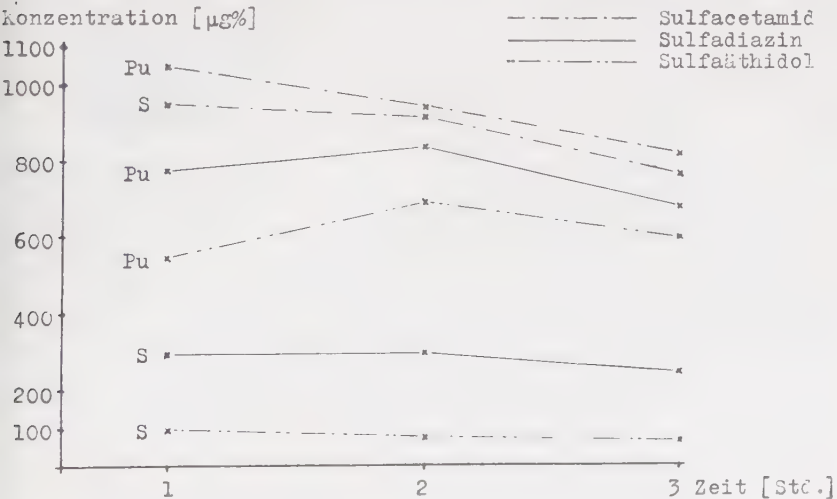
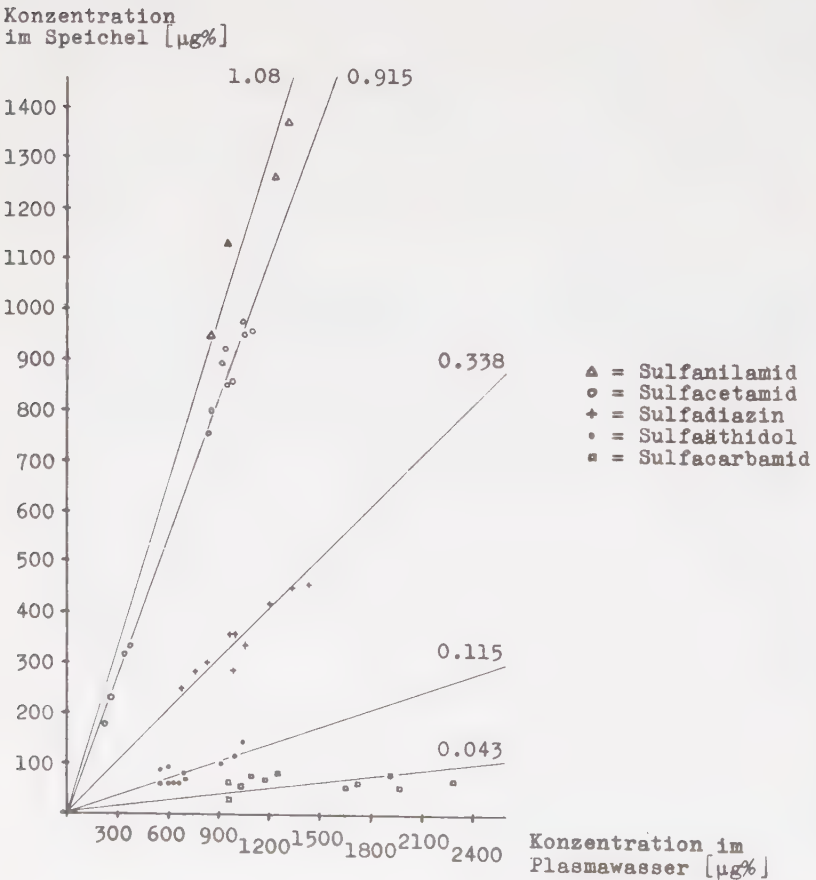


ABBILDUNG 4

Versuchsergebnisse an fünf Versuchspersonen mit fünf Sulfonamiden der bei verschiedenen Blutwasserkonzentrationen gewonnenen Speichelkonzentrationen und Einzeichnung der sich als Mittelwert ergebenden Quotienten Speichel/Blutwasser



Lebenslauf

Am 17.3.1943 wurde ich als Sohn des Pfarrers Ernst Grüneisen und seiner Ehefrau Johanna Grüneisen, geb. Dibelius, in Fürstenwerder/ Kreis Prenzlaue geboren. Nach einer Flüchtlingszeit in Hamburg lebten wir in Brandenburg/ Havel; dort starb mein Vater 1948. Schulbesuch im Osten 1949-1953, in West-Berlin von 1953 bis zum Abitur 1962. Medizin-Studium an der Freien Universität Berlin - unterbrochen durch je ein Semester in Heidelberg und Zürich - von 1962-1968. Im vierten bis sechsten klinischen Semester fertigte ich meine Dissertationsarbeit an. Im März 1969 bestand ich die ärztliche Prüfung.

Meinem Doktorvater, Professor Dr.med. Hans Witzgall, sage ich besonderen Dank für die Anregungen und das Interesse, das er mir und meiner Arbeit stets entgegenbrachte. Herrn Priv.-Doz. Dr. E. Gerhards, Schering AG, danke ich für seine Beratung bei der Durchführung des experimentellen Teiles und Frau R. Ussat für wertvolle Hinweise bei der praktischen Arbeit. Der Fa. SCHERING AG Berlin bin ich zu großem Dank verpflichtet, daß ich in ihren Labors den experimentellen Teil der Arbeit absolvieren konnte.

